

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 12 | № 2 | 2023

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

**«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 «РНЦХ

им. акад. Б.В. Петровского»

119435, Москва,

Абрикосовский пер., д. 2

**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: cem.journal@mail.ru

www.cem-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 № ФС77-83521  
от 24 июня 2022 года.

© НИИ морфологии человека  
им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ РНЦХ  
им. акад. Б.В. Петровского

## Главный редактор

*Михалева Л.М.*, член-корреспондент РАН, 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

## Ответственные секретари

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

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

*Низяева Н.В.*, доктор мед. наук, 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

*Барина И.В.*, доктор мед. наук, Москва,  
Россия

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

*Бухвалов И.Б.*, доктор биол. наук,  
профессор, Гамбург, Германия

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

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

*Коришинов 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

*Никитюк Д.Б.*, академик 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

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

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

*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

*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

*Новоцадов 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 12 | No 2 | 2023

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

“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 “Petrovsky National  
Research Centre of Surgery”  
Abrikosovsky lane, 2,  
Moscow, 119435, 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:

**7045** according  
to the “Ural-Press” agency catalog

**7045** according to the “Pressa  
Rosii” catalog via ARZI agency

The mass media registration  
certificate III № ФC77-83521  
dated June 24, 2022

© Avtsyn Research Institute  
of Human Morphology of FSBSI  
“Petrovsky National Research  
Centre of Surgery”

## Editor-in-Chief

*Mikhaleva, Lyudmila M.*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,  
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 Secretaries

*Boltovskaya, Marina N.*, Dr. Sci. Biol., Professor, Moscow, Russia

*Kondashevskaya, Marina V.*, Dr. Sci. Biol., Associate Professor, Moscow, Russia

*Nizyaeva, Natalia V.*, Dr. Sci. Med., 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

*Barinova, Irina V.*, Dr. Sci. Med., Moscow,  
Russia

*Buchwalow, Igor B.*, Dr. Sci. Biol., Professor,  
Hamburg, Germany

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

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

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

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

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

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

*Kushlinsky, Nikolai E.*, Academician  
of the Russian Academy of Sciences,  
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow,  
Russia

*Nikityuk, Dmitriy B.*, Academician  
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

*Savelyev, Sergey V.*, Dr. Sci. Biol., Professor,  
Moscow, Russia

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

## Advisory Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ  
REVIEWS**

- |   |   |   |
|---|---|---|
| <p><i>А.В. Егорова, Д.Н. Воронков, Е.Н. Федорова,<br/>Т.И. Баранич, В.В. Глинкина, В.С. Сухоруков</i><br/>Особенности строения и функции митохондрий<br/>в нейронах и глиоцитах различных отделов<br/>головного мозга лабораторных грызунов</p> | 5 | <p><i>A. V. Egorova, D. N. Voronkov, E. N. Fedorova,<br/>T. I. Baranich, V. V. Glinkina, V. S. Sukhorukov</i><br/>Structural and functional features of mitochondria in<br/>neurons and gliocytes of various cerebral regions<br/>of laboratory rodents</p> |
|---|---|---|

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ORIGINAL RESEARCH**

- |   |    |  |
|---|----|--|
| <p><i>А.А. Бахтин, Е.Л. Туманова</i><br/>Экспрессия цитокератинов реактивно<br/>измененного цилиндрического реснитчатого<br/>эпителия синоназального тракта при хронических<br/>воспалительных процессах</p>  | 14 | <p><i>A. A. Bakhtin, E. L. Tumanova</i><br/>Cytokeratin expression in reactive cylindrical<br/>ciliated epithelium of the sinonasal tract in chronic<br/>inflammation</p>  |
| <p><i>М.В. Завьялова, Д.М. Лоос, Д.С. Письменный,<br/>А.А. Дурова, Е.С. Андриюхова, Е.О. Родионов,<br/>С.В. Миллер, С.А. Тузиков, Л.А. Таширева,<br/>О.В. Панкова, В.М. Перельмутер</i><br/>Особенности распространения опухоли<br/>по воздушным пространствам у пациентов<br/>с немелкоклеточным раком легкого</p> | 25 | <p><i>M. V. Zavyalova, D. M. Loos, D. S. Pismenny,<br/>A. A. Durova, E. S. Andryukhova, E. O. Rodionov,<br/>S. V. Miller, S. A. Tuzikov, L. A. Tashireva,<br/>O. V. Pankova, V. M. Perelmuter</i><br/>Features of tumor spread through the air spaces in<br/>patients with non-small cell lung carcinoma</p> |
| <p><i>И.М. Тележникова, Л.Г. Жукова, В.В. Кометова,<br/>С.Г. Хомерики, Н.С. Карнаухов, Е.И. Хатькова,<br/>Г.Р. Сетдикова</i><br/>Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы<br/>с применением визуальной методики global</p>  | 36 | <p><i>I. M. Telezhnikova, L. G. Zhukova, V. V. Kometova,<br/>S. G. Khomeriki, N. S. Karnaukhov, E. I. Khatkova,<br/>G. R. Setdikova</i><br/>Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer<br/>using the global scoring</p>  |
| <p><i>А.Т. Абдулжалиев, И.В. Булычева, О.В. Ковалева,<br/>Е.А. Сушенцов, А.И. Сендерович, А.К. Валиев,<br/>Н.Е. Кушлинский</i><br/>Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных<br/>опухолях из оболочек периферических нервов</p>   | 44 | <p><i>A. T. Abdulzhaliyev, I. V. Boulytcheva, O. V. Kovaleva,<br/>E. A. Sushentsov, A. I. Senderovich, A. K. Valiev,<br/>N. E. Kushlinskii</i><br/>PD-L1 and PU.1 expression in malignant peripheral<br/>nerve sheath tumors</p>   |

- А.А. Шерстнев, А.М. Ковригина, Л.Г. Горенкова  
Патоморфологическая диагностика первичного  
кожного CD4-позитивного Т-клеточного  
лимфопролиферативного заболевания из мелких  
и средних клеток: серия из 28 случаев
- 54 A.A. Sherstnev, A.M. Kovrigina, L.G. Gorenkova  
Pathomorphological diagnosis of primary cutaneous  
CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative  
disorder: a 28-case series
- В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова, А.В. Калиновский,  
И.В. Суходоло, И.В. Мильто  
Влияние преждевременного рождения  
на васкуляризацию миокарда левого желудочка  
крыс в постнатальном периоде онтогенеза
- 61 V.V. Ivanova, O.N. Serebryakova, A.V. Kalinovskij,  
I.V. Sukhodolo, I.V. Milto  
Influence of preterm birth on the vascularization  
of the left ventricular myocardium of rats  
in the postnatal ontogenesis
- Н.Ю. Орлинская, С.А. Герасимов, Д.Я. Алейник,  
Д.В. Захарова, К.В. Кулакова, И.Н. Чарыкова,  
Е.А. Морозова  
Остеоинтегративные свойства имплантатов  
из титанового сплава с различным диаметром пор  
в эксперименте
- 69 N.Yu. Orlinskaya, S.A. Gerasimov, D.Ya. Aleynik,  
D.V. Zakharova, K.V. Kulakova, I.N. Charykova,  
E.A. Morozova  
Osseointegration properties of titanium implants with  
different pore diameters: experimental study
- М.Д. Качалин, Е.Н. Борхуннова, С.В. Позыбин,  
Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова,  
А.И. Довгий  
Репаративная регенерация сухожилия  
под влиянием секретома мультипотентных  
мезенхимальных стромальных клеток:  
экспериментальное исследование
- 77 M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin,  
L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova,  
A.I. Dovgii  
Reparative tendon regeneration influenced  
by multipotent mesenchymal stromal cell secretome:  
experimental study

## РЕЦЕНЗИИ

- Рецензия на монографию  
«Патологоанатом: он кто?»  
Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов
- 89 “Pathologists: who are they?”  
A monograph review  
Evgeny F. Lushnikov, Aleksandr Yu. Abrosimov
- Рецензия на учебник  
«Pathological Anatomy».  
Под редакцией В.С. Паукова
- 90 “Anatomic Pathology.”  
A textbook review  
Edited by Vyacheslav S. Paukov

## Особенности строения и функции митохондрий в нейронах и глиоцитах различных отделов головного мозга лабораторных грызунов

*А.В. Егорова<sup>1,2</sup>, Д.Н. Воронков<sup>1</sup>, Е.Н. Федорова<sup>2</sup>, Т.И. Баранич<sup>1,2</sup>, В.В. Глинкина<sup>2</sup>, В.С. Сухоруков<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

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

**Резюме.** В обзоре рассмотрены современные представления о морфологии и функциях митохондрий нейронов и глиальных клеток различных структур головного мозга лабораторных грызунов. Обсуждены основные аспекты внутриклеточной и региональной гетерогенности нейрональных митохондрий. Особое внимание уделено функциональным отличиям митохондрий разных церебральных областей. Проанализированы особенности строения и функционирования митохондрий в глиоцитах головного мозга, их участие в поддержании глионейрональных взаимодействий. Наряду с этим в обзоре представлены последние данные о возможностях межклеточного транспорта митохондрий как нового нейропротекторного механизма на примере функционирования астроцитарно-нейронных сетей. Понимание особенностей строения и функционирования митохондрий разных областей головного мозга поможет выявить фармакологические мишени и разработать новые стратегии терапии заболеваний, развитие которых сопряжено с митохондриальной патологией.

**Ключевые слова:** митохондрии, нейроны, глиоциты, глионейрональное взаимодействие

**Для корреспонденции:** Анна Валериевна Егорова. E-mail: AV\_Egorova@bk.ru

**Для цитирования:** Егорова А.В., Воронков Д.Н., Федорова Е.Н., Баранич Т.И., Глинкина В.В., Сухоруков В.С. Особенности строения и функции митохондрий в нейронах и глиоцитах различных отделов головного мозга лабораторных грызунов. *Клин. эксп. морфология.* 2023;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.

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

Статья поступила 29.09.2022. Получена после рецензирования 11.11.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents

*A.V. Egorova<sup>1,2</sup>, D.N. Voronkov<sup>1</sup>, E.N. Fedorova<sup>2</sup>, T.I. Baranich<sup>1,2</sup>, V.V. Glinkina<sup>2</sup>, V.S. Sukhorukov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Research Center of Neurology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

**Abstract.** This review considers modern data on the morphology and functions of mitochondria in the neurons and glial cells in various brain structures of laboratory rodents. We discuss the main aspects of intracellular and regional heterogeneity of neuronal mitochondria. The functional differences between mitochondria in different cerebral regions are highlighted. We analyze the structural and functional features of mitochondria in brain gliocytes as well as their role in maintaining glioneuronal interactions. The article presents the latest information on the possibilities of intercellular transportation of mitochondria as a new neuroprotective mechanism illustrated on the functioning of astrocyte-neuron networks. Understanding the structural and functional features of mitochondria in different brain areas may help identify pharmacological targets and develop new strategies for mitochondrial disease management.

**Keywords:** mitochondria, neurons, gliocytes, glio-neuronal interaction

**Corresponding author:** Anna V. Egorova. E-mail: AV\_Egorova@bk.ru

**For citation:** Egorova A.V., Voronkov D.N., Fedorova E.N., Baranich T.I., Glinkina V.V., Sukhorukov V.S. Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(2):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.

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

**Received** 29.09.2022. **Received in revised form** 11.11.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

Роль митохондрий в жизнедеятельности клеток определяется уникальными характеристиками их морфофункциональной организации. К таким особенностям относятся следующее:

- наличие ферментов дыхательной цепи, предназначенных для аэробного синтеза энергии и организованных в четыре гигантских комплекса, способных к объединению в суперкомплексы (респирасомы) [1, 2];
- наличие собственного генома, что позволяет независимо от генома ядра обновлять в условиях высоких функциональных нагрузок наиболее значимые белки, входящие в состав комплексов дыхательной цепи [3];
- структурно-морфологический динамизм: способность к делению, слиянию и перемещению в клетке [4–6].

Митохондрии в клетке могут существовать как единичные органеллы, а также объединяться, формируя митохондриальные кластеры разного размера. Образующиеся при этом функциональные единицы (митохондриальный ретикулум) обеспечивают как внутриклеточный, так и системный энергетический гомеостаз [7, 8].

Митохондрии не только осуществляют синтез АТФ, но и вовлечены в процессы бета-окисления жирных кислот, продукцию активных форм кислорода, метаболизм кальция и железа, биосинтез гема, регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки, апоптоз, синтез стероидных гормонов, участие в противовирусном ответе [9].

Разнообразие митохондриальных форм связано с узкоспециализированными функциями клеток, их разными потребностями в энергии и типе митохондриальных субстратов, а также с различиями в физиологическом состоянии – степени энергизации, окислительно-восстановительном потенциале, значении мембранных потенциалов, уровне кальция [10]. Нарушения клеточного энергообмена, в основе которых лежит митохондриальная недостаточность, ведут к широкому спектру клинических проявлений, зависящих от степени вовлеченности в патологический процесс различных тканей и органов [11].

Количество митохондрий в клетке может варьировать от нескольких десятков до нескольких тысяч. При интенсивном аэробном обмене, характерном для нейронов головного мозга, митохондрии занимают до 60% объема клетки, что примерно равно объему гиалоплазмы и существенно больше объема других органелл. Скопления митохондрий в нейронах наиболее выражены в области структур с высокими энергетическими запросами (синаптические окончания, растущие аксоны, перехваты Ранвье) [12, 13].

В представленном обзоре на основании данных современной литературы систематизированы некоторые сведения, касающиеся морфологии и функций

митохондрий нейронов и глиальных клеток различных структур головного мозга лабораторных мышей (*Mus musculus*) и крыс (*Rattus norvegicus*). Учитывая наличие гендерных и возрастных морфофункциональных особенностей митохондрий у грызунов [13], в обзор включены источники, содержащие информацию о молодых особях (возраст преимущественно 1–4 месяца), а пол в каждом случае конкретизирован.

## Внутриклеточная митохондриальная гетерогенность

Митохондриальная гетерогенность в нейронах выражается преимущественно наличием морфологических и функциональных различий между несинаптическими митохондриями и митохондриями, которые располагаются в области синаптических терминалей (рис.).

В исследованиях последних лет показано, что синаптические митохондрии имеют меньший объем [14], отличаются сферической формой [15] и демонстрируют липидомные [16] и протеомные [17] профили, отличающиеся от таковых в несинаптических митохондриях церебральных нейронов лабораторных мышей [18]. Функционально эти различия проявляются в том, что митохондрии в области синаптических терминалей проявляют более высокую чувствительность к концентрации ионов кальция [19] и воздействию ингибиторов цепи переноса электронов [20]. В связи с этим ранняя синаптическая дисфункция, возникающая при развитии нейродегенеративного процесса, может быть объяснена в том числе высокой уязвимостью синаптических митохондрий по сравнению с их аналогами, расположенными в других частях клетки [21].

Морфология и функциональные свойства митохондрий различаются также в перикарионе и отростках нервных клеток (рис.). С помощью количественной трехмерной 3D электронной микроскопии SBF-SEM была установлена структурная специфичность аксональных, дендритных и соматических митохондрий нейронов DG и CA1 зон гиппокампа молодых (4 месяца) самок инбредных лабораторных мышей [22]. В ходе проведенных исследований выяснилось, что суммарный объем дендритных митохондрий в среднем на 116% превышает тот же показатель в аксонах и на 42% превосходит объем соматических митохондрий. Митохондрии в дендритах имеют чаще всего сферическую форму, диаметр их поперечного среза варьирует от 0,5 до 1,5 мкм, располагаются в основном в дендритных стержнях и иногда встречаются в составе шпиков [23]. Дендритные митохондрии характеризуются высоким индексом сложности, учитывающим соотношение показателей площади поверхности митохондрий и их объема [24]. Митохондрии аксонов вытянутые, 1 мкм и более в диаметре. Различается и их внутриклеточная топологическая организация: в аксонах митохондрии располагаются последовательно друг за другом, а в дендритах часто сливаются в кластеры. Такие

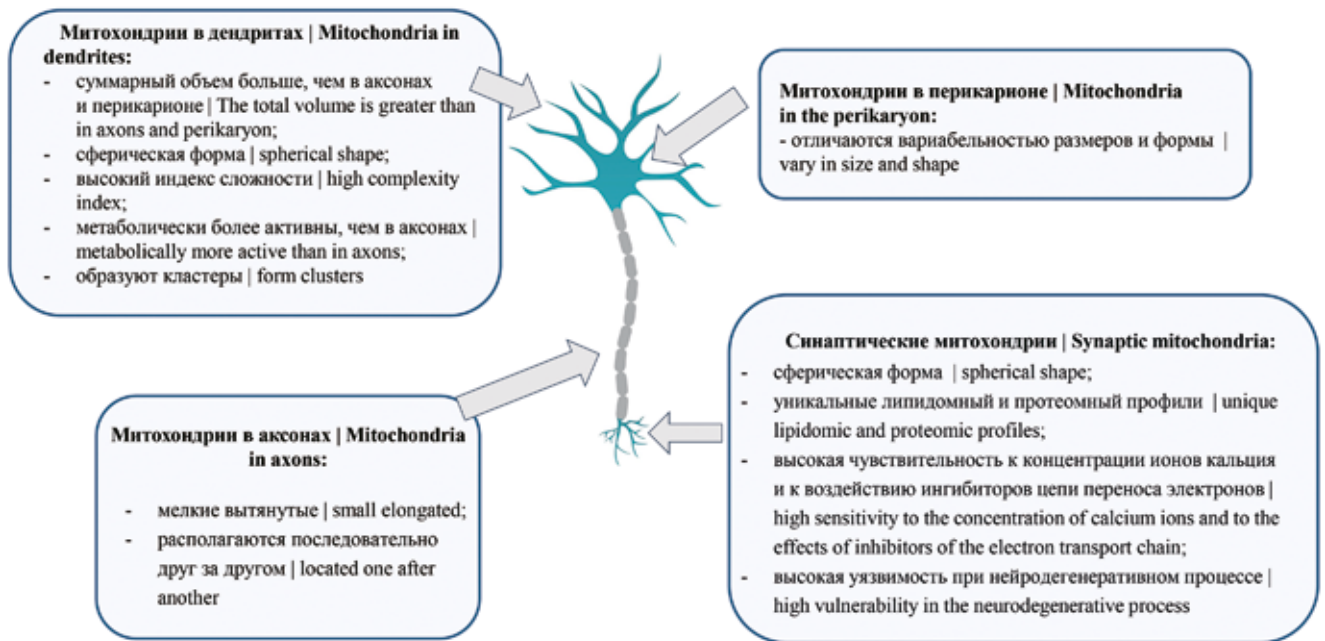


Рис. Внутриклеточная митохондриальная гетерогенность нейронов у животных моделей  
Fig. Intracellular mitochondrial heterogeneity of neurons in animal models

топографические особенности, вероятно, обусловлены необходимостью реализации транспортных процессов по аксону – мелкие дискретные митохондрии проще перемещать через его узкий просвет. В перикарионе митохондрии более разнообразны, отличаются вариабельностью размеров и формы [25]. При изучении энергетического статуса митохондрий и потенциала митохондриальной мембраны в культуре эмбриональных нейронов гиппокампа крысы обнаружено, что митохондрии в дендритах метаболически более активны, чем в аксонах, хотя причина такой дифференциальной активности неизвестна [26]. Показано, что нарушение трансляции белков внутренней митохондриальной мембраны в цитоплазме обонятельных проекционных нейронов преимущественно уменьшает процесс ветвления дендритов, в то время как морфология аксонов при аналогичных нарушениях остается относительно неизменной [27]. Таким образом, можно предположить, что дендритные митохондрии играют важную роль в морфогенезе и пластичности дендритов [28].

Способность митохондрий к модификации своей морфологии путем слияния и деления в ответ на изменения клеточной метаболической активности контролируется белком Drp1 (dynamin-related protein, динаминподобный белок), локализующимся в цитоплазме в виде димера или тетрамера и индуцирующим процесс деления митохондрий. Мутация Drp1 вызывает изменение формы митохондрии, появление толстых булавовидных митохондрий и их агрегацию в околядерные кластеры. Кроме того, отсутствие Drp1 приводит к удлинению митохондрий и их объединению в «митохондриальные трубочки» [29], которые постепенно накапливают окислительные повреждения и трансформируются в крупные сферы [30]. Точное распределение Drp1 в различ-

ных компартаментах нейрона в настоящее время остается недостаточно изученным. В исследовании T.T. Luo et al. показано, что количество Drp1 в нейронах трансгенных лабораторных мышей было больше в перикарионе и дендритах, чем в аксонах и окончаниях аксонов, что соответствовало количеству митохондрий [31]. При этом ингибирование экспрессии Drp1 в культуре эмбриональных нейронов гиппокампа крысы приводило к снижению количества дендритных митохондрий и потере дендритных шипиков [32].

### Региональная гетерогенность митохондрий нейронов головного мозга

На сегодняшний день большинство публикаций, описывающих церебральную митохондриальную дисфункцию, не обращается к региональной специфичности митохондрий. Однако каждая область головного мозга характеризуется собственными аэробно-анаэробными метаболическими потребностями, что находит отражение в изменении морфологических и особенно функциональных свойств митохондрий. Эксперименты с различными субстратами, так или иначе влияющими на митохондриальную функцию, выявили различия в уязвимости данных органелл, характерные для отдельных областей мозга [33–35]. Ряд исследований, проведенных в последние годы, позволил выявить врожденные различия в региональной митохондриальной энергетике, что может служить инструментом для дальнейших исследований избирательности дисфункции митохондрий при нейродегенеративных заболеваниях [36, 37].

Изыскания, проведенные M.H. Petersen et al. [38], демонстрируют специфические различия в функции синаптических митохондрий, выделенных из нейронов

стриатума и коры больших полушарий самок лабораторных инбредных мышей в возрасте от 8 до 12 недель. Исследователями установлено, что, несмотря на отсутствие существенной разницы в объеме данных фракций митохондрий, кортикальные синапсосомы имеют значительно более высокое базальное митохондриальное дыхание в состоянии покоя по сравнению с синапсосомами полосатого тела и, соответственно, повышенную активность электронтранспортной цепи. В активированном состоянии кортикальные синапсосомы также демонстрируют более интенсивное потребление кислорода и значительную утечку протонов. Нейроны данных областей мозга отличаются рядом функционально-морфологических признаков и прежде всего медиаторами, используемыми для нейротрансмиссии, что, возможно, является одним из объяснений выявленных особенностей функционирования митохондриального аппарата.

В работе X.P. Cheng et al. [39] для сравнения энергетического метаболизма нейронов коры больших полушарий, среднего мозга и мозжечка самцов аутбредных лабораторных крыс линии Вистар в возрасте 12 недель в качестве косвенного показателя потребления–производства АТФ использована оценка уровня свободного магния, высвобождаемого из комплекса Mg–АТФ в процессе гидролиза. Для расчета скорости потребления АТФ применены ингибиторы окислительного фосфорилирования и гликолиза. Авторы констатируют, что наиболее высокую скорость метаболизма АТФ демонстрировали нейроны среднего мозга, вероятно поэтому энергетический дисбаланс в данной области мозга может быть сопряжен с развитием ряда заболеваний, в частности с процессом нейродегенерации при болезни Паркинсона [40–42].

Неоднородность распределения АТФ-синтазы в структурах обонятельного мозга, гиппокампа, неокортекса, коре мозжечка крыс иммуногистохимическим методом исследовалась в работе Е.В. Узловой и С.М. Зиматкина [43]. Наибольшее содержание АТФ-синтазы обнаружено в крупных ганглиозных нейронах – пирамидных нейронах гиппокампа, внутреннем пирамидном слое неокортекса.

Гетерогенность отмечалась и при распределении белка Drp1 в различных зонах мозга. Так, в грушевидных нейронах мозжечка самцов инбредных лабораторных мышей экспрессия белка Drp1 была достаточно высокой, в пирамидных нейронах II, V и VI слоев коры головного мозга умеренной, в области гиппокампа, за исключением некоторых нейронов полиморфного слоя зубчатой извилины и поля CA1, слабо выраженной [31].

В исследовании S. Spadini et al. [44] изучался протеомный профиль митохондрий клеток различных тканей молодых самцов аутбредных крыс, в том числе нейронов мозжечка, гиппокампа, двигательной и зрительной зон коры больших полушарий. В работе использовался комплексный метод оценки количества и соотношения митохондриальной и геномной ДНК

(при помощи количественной полимеразной цепной реакции) и белков митохондриальных мембран, полученных из уникального лизата, приготовленного в условиях мягкого лизиса без стандартной стадии экстракции. Было установлено переменное соотношение митохондриальной и ядерной ДНК в разных участках головного мозга крысы, при этом наименьшее относительное количество копий митохондриальной ДНК зафиксировано в мозжечке. Полученная корреляция между невысоким числом копий митохондриальной ДНК и активностью нейронов может быть объяснена более низким уровнем аэробного гликолиза в мозжечке по сравнению с корой больших полушарий, что также подтверждено S.N. Vaishnavi et al. [45].

Еще один подход для изучения регионарной церебральной митохондриальной энергетики был представлен в работе J.V. Andersen et al. [46], где оценивалась скорость потребления кислорода и синтеза АТФ в изолированных несинаптических митохондриях коры головного мозга, гиппокампа и стриатума самцов аутбредных мышей в возрасте 12 недель. В ходе эксперимента установлено, что митохондриальная эффективность, определяемая как отношение количества произведенного АТФ к количеству потребленного  $O_2$ , являлась одинаковой для трех исследованных регионов. Однако митохондрии гиппокампа демонстрировали самую низкую базальную и стимулированную АДФ скорость потребления кислорода, а также показывали высокую утечку протонов и способность к несвязанному дыханию в обход АТФ-синтазы. По мнению авторов, высокая утечка протонов могла быть обусловлена особым строением митохондриальной мембраны нейронов гиппокампа, в частности наличием разобщающих белков UCPs, что требует изучения их роли в головном мозге как возможных участников процесса нейродегенерации [47].

### Митохондрии в глиоцитах головного мозга

Глиальные клетки обеспечивают жизнедеятельность и функционирование нейронов. Несмотря на выраженную гетерогенность глиоцитов, их объединяет одна фундаментальная задача – поддержание баланса в центральной нервной системе. Любые изменения глиальных регуляторных функций могут или стать триггером патологического процесса, или в значительной степени способствовать прогрессированию заболеваний [48].

Учитывая существенную функциональную нагрузку, требующую повышенных энергозатрат, все разновидности глиоцитов головного мозга обладают множественными митохондриями, которые тем не менее всегда характеризуются типичным ультрамикроскопическим строением. Так, давно установленным фактом является способность глиальных клеток головного мозга к биосинтезу стероидных гормонов (нейростероидов) [49], однако сканирующая электронная микроскопия не выявила в глиоцитах наличие митохондрий с тубулярно-везикулярными кристами, характерных для стероидсинтезирующих клеток [50].



Астроглиоциты – самый распространенный и разнообразный тип глиальных клеток в центральной нервной системе. Астроглия участвует в формировании гематоэнцефалического барьера, регулирует церебральную микроциркуляцию, а также баланс внеклеточной концентрации нейротрансмиттеров и ионов в центральной нервной системе, обеспечивает нейрональный обмен веществ и структурную поддержку синапсов, совместно с микроглией продуцирует широкий спектр хемокинов и цитокинов, влияя на иммунную защиту мозга [51].

Морфологической особенностью астроглиоцитов является то, что наибольший объем цитоплазмы находится в сильно ветвящихся отростках. В исследованиях прежних лет [52] перисинаптические отростки астроцитов обычно описывались как структуры, практически лишенные таких органелл как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, эндосомы. В более поздних работах [53, 54] иногда упоминались отдельные везикулы, эндосомы или митохондрии в составе отростков астроглии.

В исследовании А. Aboufares et al. [55] с использованием сканирующей электронной микроскопии была получена реконструкция перисинаптических отростков астроглиоцитов в трех измерениях в двигательных и сенсорных областях коры больших полушарий самцов инбредных лабораторных мышей в возрасте 4 недель. Установлено, что большинство (около 60%) митохондрий расположено в крупных (>250 нм в диаметре) отростках астроцитов, около трети отростков более мелкого диаметра имеет по крайней мере одну органеллу, большинство самых мелких отростков было пустыми. Различия между распределением органелл соматосенсорной и передней поясной коры не отмечены. В среднем митохондрии астроглиоцитов имеют размеры 1,4–3 мкм, но в ряде новых работ показано наличие миниатюрных митохондрий в тонких отростках, менее 1 мкм диаметром [56, 57].

Передача  $\text{Ca}^{2+}$  сигналов, включая трансмембранную передачу сигнала, имеет принципиальное значение для регуляции функций астроглиоцитов и их взаимодействия друг с другом и нейронами [58]. Митохондрии участвуют в регуляции уровня кальция в цитозоле через митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$  унипортер (MCU) и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  переносчик (NCX), а особенности буферизации  $\text{Ca}^{2+}$  астроглиоцитами связаны с митохондриальным транспортом и локализацией данных органелл в отростках. В экспериментах *in vivo* [59] было показано, что скорость перемещения митохондрий в астроглии значительно ниже, чем в нейронах, более того, большинство митохондрий астроглиоцитов сохраняет неподвижность. По-видимому, это связано с наличием якорных белков, подобных обнаруженному в нейронах синтафиллину, поддерживающему локализацию митохондрий в аксонах [60]. Однако синтафиллин в астроглиоцитах отсутствует, что также указывает на принципиальные различия митохондриального транспорта

в глии и нейронах. Перемещение митохондрий в отростках астроглиоцитов осуществляется в соответствии со спецификой глионейрональных взаимодействий. Так, глутаматные транспортеры в астроглиоцитах образуют комплексы с митохондриями и гликолитическими ферментами, причем нейрональная активность увеличивает подвижность митохондрий в отростках астроглии [61]. Эти данные демонстрируют важность организации митохондрий в астроглии в связи с глионейрональными взаимодействиями, включающими регуляцию и обмен глутамата.

В работе С. Fecher et al. [62] был определен митохондриальный протеом трех типов клеток мозжечка – клеток Пуркинью, клеток-зерен и астроглиоцитов и установлены различия в белковой организации нейрональных и глиальных митохондрий молодых самцов трансгенных лабораторных мышей. При иммунофлуоресцентном окрашивании в астроцитарных митохондриях обнаружено повышенное по сравнению с нейронами содержание ферментов участвующих в процессах бета-окисления жирных кислот: ацил-кофермент А дегидрогеназы и карнитин-пальмитоилтрансферазы. Этот факт демонстрирует, что митохондрии астроглиоцитов метаболизируют длинноцепочечные жирные кислоты более эффективно, чем митохондрии нейронов. Полученные данные говорят о том, что для производства энергии головной мозг не только полагается на глюкозу, но также использует жирные кислоты.

Митохондрии олигодендроглии отличаются от астроцитарных: в основных отростках олигодендроглиоцитов они имеют меньшие размеры (0,8–1,2 мкм) и при этом бедны кристами. Показаны меньшая мобильность и пониженная скорость движения митохондрий в олигодендроглии по сравнению с астроглиоцитами. Интересно, что глутамат подавляет движение митохондрий в нейронах и астроглиоцитах, тогда как в олигодендроглии он оказывает обратное действие [63], что указывает на разницу в регуляции митохондриальной динамики.

### Межклеточный транспорт митохондрий

Известно, что астроглиоциты, как и клетки многих других типов, избавляются от своих собственных поврежденных митохондрий посредством митофагии, которая усиливается после острого повреждения [64], возможно, для минимизации пагубных последствий окислительного стресса и дисрегуляции кальциевого баланса. Установлено, что астроглиоциты не только активно разрушают собственные поврежденные митохондрии, но и захватывают и утилизируют митохондрии, высвободившиеся из других клеток. Об этой форме «трансмитофагии» впервые сообщили С.Н. Davis et al. [65], которые показали, что митохондрии с флуоресцентной меткой из здоровых ганглионарных нейронов сетчатки в большом количестве присутствуют в лизосомах астроглиоцитов самцов лабораторных мышей инбредной линии в возрасте 3 и 9 месяцев.

Интересно, что межклеточный транспорт митохондрий в астроцитарно-нейронных сетях работает в обоих направлениях. Кроме того что нейроны имеют тенденцию передавать поврежденные митохондрии астроцитам для деградации, показано, что активированные астроциты могут жертвовать часть своих здоровых митохондрий соседним поврежденным нейронам, что, в свою очередь, приводит к усилению их жизнеспособности [66].

В последние годы исследователи все чаще высказывают гипотезу о возможности «горизонтального переноса» митохондрий через астроцитарные микровезикулы для сохранения нейронов, пребывающих в условиях энергодефицита.

Обнаружено, что высвобождение митохондриально-содержащих везикул из астроцитов зависит от сигнального пути  $Ca^{2+}$ -CD38-цАДФР [67]. CD38 – трансмембранный гликопротеин, компонент клеточных сигнальных систем, сопряженных в клетках нервной системы с рецепторами ряда нейротрансмиттеров [68]. Субстратами CD38 служат НАД<sup>+</sup>, цАДФР, НАДФ [69]. Известны два основных типа ферментативной активности CD38 – АДФ-рибозилциклазная и цАДФ-рибозилгидролазная, которые катализируют образование циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из НАД<sup>+</sup> и гидролиз цАДФР до АДФ-рибозы, соответственно. Циклическая АДФР и НАДФ<sup>+</sup> – мощные мобилизаторы  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо в различных типах клеток [70]. Активация астроцитарного CD38 с использованием системы CRISPR/Cas9 значительно увеличивает высвобождение митохондриально-содержащих везикул, которые при добавлении к нейронам с кислородно-глюкозным голоданием восстанавливают выработку энергии в нейронах. K. Nayaakawa et al. впоследствии подтвердили эти наблюдения на интактных мышцах, показав, что флуоресцентно помеченные астроцитарные митохондрии передаются нейронам после транзиторного ишемического инсульта. Митохондрии, происходящие из астроцитов, сливались с митохондриями нейронов в перинфарктной зоне неокортекса и были связаны с активацией путей выживания клеток. Больше того, блокада CD38 у мышечей, перенесших инфаркт, негативно влияет на ряд показателей функционального исхода. Предполагается, что опосредованное астроцитами высвобождение митохондрий происходит в головном мозге до тех пор, пока сохраняется передача сигналов CD38. В настоящее время неизвестно, используется ли аналогичный нейропротекторный механизм при других хронических нейродегенеративных состояниях [71].

## Заключение

Резюмируя изложенное, следует отметить, что митохондрии нейронов и глиоцитов головного мозга животных моделей демонстрируют многочисленные признаки как внутриклеточной, так и региональной морфофункциональной гетерогенности.

1. В пределах нейрона значительные морфологические и функциональные различия имеют митохондрии

синаптического и несинаптического пула, при этом наибольшей метаболической активностью отличаются митохондрии, находящиеся в концевых терминалах дендритов.

2. Серьезные отличия спектра функциональных возможностей наблюдаются у нейрональных митохондрий разных областей головного мозга, что делает отдельные церебральные зоны, такие как структуры среднего мозга и гиппокампа, наиболее уязвимыми к дефициту энергии.

3. Региональное разнообразие церебральных митохондрий особенно заметно в критических условиях, когда возникает необходимость прежде всего обеспечить выживание нейрона за счет сокращения затрат на поддержание клеточного гомеостаза, существующих в норме.

4. Глиальные митохондрии часто демонстрируют повышенную функциональную активность по сравнению с нейрональными митохондриями, что необходимо для поддержания оптимального уровня глионейронных взаимодействий.

5. Недавно открытый межклеточный транспорт митохондрий в астроцитарно-нейронных цепях может рассматриваться в качестве нового нейропротекторного механизма, закономерности которого требуют пристального внимания и дальнейшего изучения.

Таким образом, морфофункциональная гетерогенность митохондрий и различия в региональной церебральной энергетике обуславливают селективность поражения различных отделов головного мозга при развитии нейродегенеративных и прочих заболеваний центральной нервной системы. Дальнейшее изучение особенностей строения и функционирования митохондрий разных областей головного мозга поможет выявить фармакологические мишени и разработать новые стратегии терапии болезней, развитие которых сопряжено с митохондриальной патологией.

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

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

## Литература/References

1. *Stuchebrukhov A, Schäfer J, Berg J, Brzezinski P.* Kinetic advantage of forming respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2020;1861(7):148193. DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148193.
2. *Vercellino I, Sazanov LA.* The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(2):141–61. DOI: 10.1038/s41580-021-00415-0.
3. *Kummer E, Ban N.* Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(5):307–25. DOI: 10.1038/s41580-021-00332-2.
4. *Baker N, Patel J, Khacho M.* Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion.* 2019;49:259–68. DOI: 10.1016/j.mito.2019.06.003.

5. *Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L.* The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):204–24. DOI: 10.1038/s41580-020-0210-7.
6. *Хилажева Е.Д., Писарева Н.В., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Таранушенко Т.Е., Фролова О.В. и др.* Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриальный биогенез в клетках церебрального эндотелия. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2017;11(1):34–39. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28944097> (получено 20.09.2022).  
*Khilazheva ED, Pisareva NV, Morgun AV, Boitsova EB, Taranushenko TE, Frolova OV et al.* Activation of lactate receptors GPR81 stimulates mitochondrial biogenesis in endothelial cells of cerebral microvessels. *Annaly Klinicheskoy i Eksperimental'noy Nevrologii = Annals of Clinical and Experimental Neurology.* 2017;11(1):34–39 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28944097> (accessed 20.09.2022).
7. *Murata D, Arai K, Iijima M, Sesaki H.* Mitochondrial division, fusion and degradation. *J Biochem.* 2020;167(3):233–41. DOI: 10.1093/jb/mvz106.
8. *Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J.* Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341–60. DOI: 10.1042/EBC20170104.
9. *Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge MV.* Functional mitochondria in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:296. DOI: 10.3389/fendo.2017.00296.
10. *Лукьянова Л.Д.* Сигнальные механизмы гипоксии. Москва: РАН, 2019. 215 с.  
*Lukyanova LD.* Signaling mechanisms of hypoxia. Moscow: RAN, 2019. 215 p. (In Russ.)
11. *Zhou Z, Austin GL, Young LEA, Johnson LA, Sun R.* Mitochondrial metabolism in major neurological diseases. *Cells.* 2018;7(12):229. DOI: 10.3390/cells7120229.
12. *Sleigh JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G.* Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(12):691–703. DOI: 10.1038/s41582-019-0257-2.
13. *Lee JH, Jang EH, Kim SA.* Brain region and sex-specific changes in mitochondrial biogenesis induced by acute trimethyltin exposure. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2022;20(3):474–81. DOI: 10.9758/cpn.2022.20.3.474.
14. *Mendelsohn R, Garcia GC, Bartol TM, Lee CT, Khandelwal P, Liu E et al.* Morphological principles of neuronal mitochondria. *J Comp Neurol.* 2022;530(6):886–902. DOI: 10.1002/cne.25254.
15. *Fedorovich SV, Waseem TV, Puchkova LV.* Biogenetic and morphofunctional heterogeneity of mitochondria: The case of synaptic mitochondria. *Rev Neurosci.* 2017;28(4):363–73. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0077.
16. *Basu Ball W, Neff JK, Gohil VM.* The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Lett.* 2018;592(8):1273–90. DOI: 10.1002/1873-3468.12887.
17. *Гомазков О.А.* Нейропротеомика, или как множества белков отражают функции мозга. *Успехи современной биологии.* 2020;140(4):347–358. DOI: 10.31857/S0042132420040079.  
*Gomazkov OA.* Neuroproteomics or how dozens of proteins reflect brain functions. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 2020;140(4):347–358 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0042132420040079.
18. *Morgenstern M, Peikert CD, Lübbert P, Suppanz I, Klemm C, Alka O et al.* Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. *Cell Metab.* 2021;33(12):2464–2483.e18. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.11.001.
19. *Devine MJ, Kittler JT.* Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(2):63–80. DOI: 10.1038/nrn.2017.170.
20. *Takeuchi A, Matsuoka S.* Minor contribution of NCX to Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange activity in brain mitochondria. *Cell Calcium.* 2021;96:102386. DOI: 10.1016/j.ceca.2021.102386.
21. *Fedorovich S, Hofmeijer J, van Putten MJ, le Feber J.* Reduced synaptic vesicle recycling during hypoxia in cultured cortical neurons. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:32. DOI: 10.3389/fncel.2017.00032.
22. *Faigt J, Lacefield C, Davey T, White K, Laws R, Kosmidis S et al.* 3D neuronal mitochondrial morphology in axons, dendrites, and somata of the aging mouse hippocampus. *Cell Rep.* 2021;36(6):109509. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109509.
23. *Santuy A, Turégano-López M, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, DeFelipe J, Merchán-Pérez A.* A quantitative study on the distribution of mitochondria in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 2018;28(10):3673–84. DOI: 10.1093/cercor/bhy159.
24. *Vincent AE, White K, Davey T, Philips J, Ogden RT, Lawless C et al.* Quantitative 3D mapping of the human skeletal muscle mitochondrial network. *Cell Rep.* 2019;26(4):996–1009.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.010.
25. *Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н.* Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2015;115(6):115. DOI: 10.17116/jnevro201511561115.  
*Semchenko VV, Stepanov SS, Bogolepov NN.* Brain synaptic plasticity (fundamental and applied aspects). *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2015;115(6):115 (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro201511561115.
26. *Chien L, Liang MZ, Chang CY, Wang C, Chen L.* Mitochondrial therapy promotes regeneration of injured hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(9PtB):3001–12. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.06.012.
27. *Chihara T, Luginbuhl D, Luo L.* Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nat Neurosci.* 2007;10(7):828–37. DOI: 10.1038/nn1910.
28. *Chen F, Ardalan M, Elfving B, Wegener G, Madsen TM, Nyengaard JR.* Mitochondria are critical for BDNF-mediated synaptic and vascular plasticity of hippocampus following repeated electroconvulsive seizures. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(3):291–304. DOI: 10.1093/ijnp/pyx115.
29. *Ren X, Chen L, Xie J, Zhang Z, Dong G, Liang J et al.* Resveratrol ameliorates mitochondrial elongation via Drp1/Parkin/PINK1 signaling in senescent-like cardiomyocytes. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4175353. DOI: 10.1155/2017/4175353.
30. *Cho B, Choi SY, Cho HM, Kim HJ, Sun W.* Physiological and pathological significance of dynamin-related protein 1 (drp1)-dependent mitochondrial fission in the nervous system. *Exp Neurobiol.* 2013;22(3):149–57. DOI: 10.5607/en.2013.22.3.149.

31. Luo TT, Dai CQ, Wang JQ, Wang ZM, Yang Y, Zhang KL et al. Drp1 is widely, yet heterogeneously, distributed in the mouse central nervous system. *Mol Brain*. 2020;13(1):90. DOI: 10.1186/s13041-020-00628-y.
32. Itoh K, Murata D, Kato T, Yamada T, Araki Y, Saito A et al. Brain-specific Drp1 regulates postsynaptic endocytosis and dendrite formation independently of mitochondrial division. *Elife*. 2019;8:e44739. DOI: 10.7554/eLife.44739.
33. Burtscher J, Zangrandi L, Schwarzer C, Gnaiger E. Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry. *Mitochondrion*. 2015;25:104–12. DOI: 10.1016/j.mito.2015.10.007.
34. Barros LF, Bolaños JP, Bonvento G, Bouzier-Sore AK, Brown A, Hirrlinger J et al. Current technical approaches to brain energy metabolism. *Glia*. 2018;66(6):1138–59. DOI: 10.1002/glia.23248.
35. Osorio-Paz I, Ramírez-Pérez G, Hernández-Ramírez JE, Uribe-Carvajal S, Salceda R. Mitochondrial activity in different regions of the brain at the onset of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Mol Biol Rep*. 2018;45(5):871–9. DOI: 10.1007/s11033-018-4233-5.
36. Martínez-Vicente M. Neuronal mitophagy in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:64. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00064.
37. Andersen JV, Jakobsen E, Waagepetersen HS, Aldana BI. Distinct differences in rates of oxygen consumption and ATP synthesis of regionally isolated non-synaptic mouse brain mitochondria. *J Neurosci Res*. 2019;97(8):961–74. DOI: 10.1002/jnr.24371.
38. Petersen MH, Willert CW, Andersen JV, Waagepetersen HS, Skotte NH, Nørremølle A. Functional differences between synaptic mitochondria from the striatum and the cerebral cortex. *Neuroscience*. 2019;406:432–43. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.033.
39. Cheng X, Vinokurov AY, Zhrebtsov EA, Stelmashchuk OA, Angelova PR, Esteras N et al. Variability of mitochondrial energy balance across brain regions. *J Neurochem*. 2021;157(4):1234–43. DOI: 10.1111/jnc.15239.
40. Abramov A, Angelova P. Mitochondrial dysfunction and energy deprivation in the mechanism of neurodegeneration. *Turk J Biochem*. 2019;44(6):723–9. DOI: 10.1515/tjb-2019-0255.
41. Dagda RK. Role of mitochondrial dysfunction in degenerative brain diseases, an overview. *Brain Sci*. 2018;8(10):178. DOI: 10.3390/brainsci8100178.
42. Currim F, Singh J, Shinde A, Gohel D, Roy M, Singh K et al. Exosome release is modulated by the mitochondrial-lysosomal crosstalk in Parkinson's disease stress conditions. *Mol Neurobiol*. 2021;58(4):1819–33. DOI: 10.1007/s12035-020-02243-3.
43. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. АТФ-синтаза митохондрий. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020;18(6):648–654. DOI: 10.25298/2221-8785-2020-18-6-648-654.  
Uzlova EV, Zimatkin SM. Mitochondrial ATP synthase. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2020;18(6):648–654 (In Russ.). DOI: 10.25298/2221-8785-2020-18-6-648-654.
44. Spadini S, Racchetti G, Adiletta A, Lamanna J, Moro AS, Ferro M et al. A novel integrated approach to estimate the mitochondrial content of neuronal cells and brain tissues. *J Neurosci Methods*. 2021;363:109351. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2021.109351.
45. Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(41):17757–62. DOI: 10.1073/pnas.1010459107.
46. Andersen JV, Jakobsen E, Waagepetersen HS, Aldana BI. Distinct differences in rates of oxygen consumption and ATP synthesis of regionally isolated non-synaptic mouse brain mitochondria. *J Neurosci Res*. 2019;97(8):961–74. DOI: 10.1002/jnr.24371.
47. Sepehr A, Taheri F, Heidarian S, Motaghinejad M, Safari S. Neuroprotective and neuro-survival properties of safinamide against methamphetamine-induced neurodegeneration: Hypothetical possible role of BDNF/TrkB/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway and mitochondrial uncoupling protein-2 (UCP-2). *Med Hypotheses*. 2020;143:110094. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110094.
48. Кушнирева Л.А., Кorkотян Э.А., Семьянов А.В. Незаслуженно забытые: место глиальных клеток в гипотезах возникновения болезни Альцгеймера. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019;105(9):1067–1095. DOI: 10.1134/S0869813919090085.  
Kushnirava LA, Korkotian EA, Semyanov AV. Undeservedly forgotten: the place of glial cells among the hypothesis of Alzheimer's. *Russian Journal of Physiology*. 2019;105(9):1067–1095 (In Russ.). DOI: 10.1134/S0869813919090085.
49. Brann DW, Lu Y, Wang J, Zhang Q, Thakkar R, Sareddy GR et al. Brain-derived estrogen and neural function. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022;132:793–817. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2021.11.014.
50. Гасанова И.Х., Кунца В.Н., Ермола Ю.А., Гасанли З.Х., Новосельская Н.А. Анатомические особенности ультраструктуры сосудистых сплетений желудочков головного мозга новорожденных крыс в контроле и при введении ксеногенного ликвора. Современные проблемы науки и образования. 2018;2:66. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=34954684> (получено 20.09.2022).  
Gasanova IK, Kunitsa VN, Ermola YA, Gasanli ZK, Novoselskaya NA. Anatomical peculiarities of intraventricular vascular plexi ultrastructure of normal newborn rats and exposed to cerebrospinal fluid. *Modern Problems of Science and Education*. 2018;2:66 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=34954684> (accessed 20.09.2022).
51. Jackson JG, Robinson MB. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia*. 2018;66(6):1213–34. DOI: 10.1002/glia.23252.
52. Peters A, Palay SL, Webster H de F. The fine structure of the nervous system: Neurons and their supporting cells. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1991. 494 p.
53. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(6):665–73. DOI: 10.1111/cns.13123.
54. Allen NJ, Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron*. 2017;96(3):697–708. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
55. Aboufares El Alaoui A, Jackson M, Fabri M, de Vivo L, Bellesi M. Characterization of subcellular organelles in cortical perisynaptic astrocytes. *Front Cell Neurosci*. 2021;14:573944. DOI: 10.3389/fncel.2020.573944.
56. Benjamin Kacerovsky J, Murai KK. Stargazing: Monitoring subcellular dynamics of brain astrocytes. *Neuroscience*. 2016;323:84–95. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.007.

57. *Aten S, Kiyoshi CM, Arzola EP, Patterson JA, Taylor AT, Du Y et al.* Ultrastructural view of astrocyte arborization, astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts, intracellular vesicle-like structures, and mitochondrial network. *Prog Neurobiol.* 2022;213:102264. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2022.102264.
58. *Héja L, Kardos J.* NCX activity generates spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillations in the astrocytic leaflet microdomain. *Cell Calcium.* 2020;86:102137. DOI: 10.1016/j.ceca.2019.102137.
59. *Jackson JG, Robinson MB.* Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia.* 2018;66(6):1213–34. DOI: 10.1002/glia.23252.
60. *Cheng XT, Sheng ZH.* Developmental regulation of microtubule-based trafficking and anchoring of axonal mitochondria in health and diseases. *Dev Neurobiol.* 2021;81(3):284–99. DOI: 10.1002/dneu.22748.
61. *Robinson MB, Lee ML, DaSilva S.* Glutamate transporters and mitochondria: Signaling, co-compartmentalization, functional coupling, and future directions. *Neurochem Res.* 2020;45(3):526–40. DOI: 10.1007/s11064-020-02974-8.
62. *Fecher C, Trovò L, Müller SA, Snaidero N, Wettmarshausen J, Heink S et al.* Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nat Neurosci.* 2019;22(10):1731–42. DOI: 10.1038/s41593-019-0479-z.
63. *Rinholm JE, Vervaeke K, Tadross MR, Tkachuk AN, Kopek BG, Brown TA et al.* Movement and structure of mitochondria in oligodendrocytes and their myelin sheaths. *Glia.* 2016;64(5):810–25. DOI: 10.1002/glia.22965.
64. *Quintana DD, Garcia JA, Sarkar SN, Jun S, Engler-Chiurazzi EB, Russell AE et al.* Hypoxia-reoxygenation of primary astrocytes results in a redistribution of mitochondrial size and mitophagy. *Mitochondrion.* 2019;47:244–55. DOI: 10.1016/j.mito.2018.12.004.
65. *Davis CH, Kim KY, Bushong EA, Mills EA, Boassa D, Shih T et al.* Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(26):9633–8. DOI: 10.1073/pnas.1404651111.
66. *Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature.* 2016;535(7613):551–5. DOI: 10.1038/nature18928.
67. *Park JH, Lo EH, Hayakawa K.* Endoplasmic reticulum interaction supports energy production and redox homeostasis in mitochondria released from astrocytes. *Transl Stroke Res.* 2021;12(6):1045–54. DOI: 10.1007/s12975-021-00892-7.
68. *Klimova N, Kristian T.* Multi-targeted effect of nicotinamide mononucleotide on brain bioenergetic metabolism. *Neurochem Res.* 2019;44(10):2280–7. DOI: 10.1007/s11064-019-02729-0.
69. *Lee HC, Deng QW, Zhao YJ.* The calcium signaling enzyme CD38 – a paradigm for membrane topology defining distinct protein functions. *Cell Calcium.* 2022;101:102514. DOI: 10.1016/j.ceca.2021.102514.
70. *Park JH, Hayakawa K.* Extracellular mitochondria signals in CNS disorders. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:642853. DOI: 10.3389/fcell.2021.642853.
71. *Gollihue JL, Norris CM.* Astrocyte mitochondria: Central players and potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases and injury. *Ageing Res Rev.* 2020;59:101039. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101039.

### Информация об авторах

Анна Валериевна Егорова – кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Дмитрий Николаевич Воронков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Евгения Николаевна Федорова – ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Татьяна Ивановна Баранич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Валерия Владимировна Глинкина – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Владимир Сергеевич Сухоруков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией нейроморфологии Научного центра неврологии, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### Author information

Anna V. Egorova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Evgenia N. Fedorova – Assistant, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2128-9056>

Tatyana I. Baranich – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-8999-9986>

Valeria V. Glinkina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-8708-6940>

Vladimir S. Sukhorukov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology; Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>

## Экспрессия цитокератинов реактивно измененного цилиндрического реснитчатого эпителия синоназального тракта при хронических воспалительных процессах

А.А. Бахтин<sup>1</sup>, Е.Л. Туманова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии ФМБА России, Москва, Россия

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

**Резюме. Введение.** В настоящее время крайне мало работ, посвященных изменениям многорядного реснитчатого цилиндрического эпителия (МРЦЭ) синоназального тракта при хронических воспалительных процессах, в частности при базальноклеточной гиперплазии, являющейся аналогом дисплазии различной степени тяжести многослойного плоского неороговевающего эпителия. Изучение изменений МРЦЭ может уточнить гистогенез эпителиальных опухолей синоназального тракта, в том числе синоназальных папиллом. Цель исследования – иммуногистохимическая характеристика пролиферативного потенциала и экспрессии различных цитокератинов покровного эпителия на участках с базальноклеточной гиперплазией при хроническом неспецифическом воспалительном процессе.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлся операционный материал, полученный от 567 пациентов с диагнозами «хронический полипозный риносинусит» и «воспалительный полип». Иммуногистохимическое исследование проведено в 20 случаях с использованием панели антител к Ki-67, Stathmin, Cytokeratin 7, Cytokeratin 10/13, Cytokeratin 14, Cytokeratin 17, Cytokeratin 18, Cytokeratin 19. **Результаты.** При окрашивании гематоксилином и эозином в 74% случаев (419 наблюдений) отмечалась базальноклеточная гиперплазия различной степени выраженности, в 13% (73 наблюдения) базальноклеточная гиперплазия сочеталась с очагами плоскоклеточной метаплазии. Выделено четыре морфологических варианта изменений эпителиального пласта: слабо выраженная, умеренно выраженная и выраженная гиперплазия базальных клеток, участки плоскоклеточной метаплазии с характерным цитокератиновым профилем.

**Заключение.** Одновременная экспрессия цитокератинов на участках с выраженной гиперплазией базальных клеток, характерных как для однослойного, так и для многослойного эпителия, позволяет рассматривать данные зоны как наиболее вероятные для развития разных эпителиальных опухолей синоназального тракта, в том числе различных типов синоназальных папиллом.

**Ключевые слова:** базальноклеточная гиперплазия, синоназальная папиллома, многорядный цилиндрический реснитчатый эпителий

**Для корреспонденции:** Артур Александрович Бахтин. E-mail: lor-pathology@yandex.ru

**Для цитирования:** Бахтин А.А., Туманова Е.Л. Экспрессия цитокератинов реактивно измененного цилиндрического реснитчатого эпителия синоназального тракта при хронических воспалительных процессах. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):14–24. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.14-24.

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

Статья поступила 23.09.2022. Получена после рецензирования 01.11.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## Cytokeratin expression in reactive cylindrical ciliated epithelium of the sinonasal tract in chronic inflammation

A.A. Bakhtin<sup>1</sup>, E.L. Tumanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center of Otorhinolaryngology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Currently, there are limited papers on changes in the pseudostratified ciliated columnar epithelium of the sinonasal tract in chronic inflammatory processes, particularly in basal cell hyperplasia. The latter is similar to dysplasia of varying severity of the stratified squamous nonkeratinized epithelium. Studying of changes in the pseudostratified ciliated columnar epithelium can clarify the histogenesis of various

epithelial tumors of the sinonasal tract, including sinonasal papillomas. The research is aimed at studying the cytokeratin profile of reactive cylindrical ciliated epithelium in a chronic nonspecific inflammatory process. *Materials and methods.* We analyzed surgical materials obtained from 567 patients diagnosed with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. We performed an immunohistochemical study in 20 cases using the panel of antibodies to Ki-67, Stathmin, Cytokeratin 7, Cytokeratin 10/13, Cytokeratin 14, Cytokeratin 17, Cytokeratin 18, and Cytokeratin 19.

*Results.* Using hematoxylin and eosin staining, we detected basal cell hyperplasia of different severity in 74% (419 cases). In 13% (73 cases), basal cell hyperplasia was combined with foci of squamous metaplasia. Based on the results, we identified 4 types of morphological changes in the epithelial layer with a specific cytokeratin profile: mild basal cell hyperplasia, moderate basal cell hyperplasia, severe basal cell hyperplasia, and areas of squamous metaplasia.

*Conclusion.* Simultaneous expression of cytokeratins in the areas with severe hyperplasia of basal cells, specific for both simple and compound epithelia, allows us to consider this area to have the highest potential for the development of various epithelial tumors of the sinonasal tract, including various types of sinonasal papillomas.

**Keywords:** basal cell hyperplasia, sinonasal papilloma, pseudostratified columnar ciliated epithelium

**Corresponding author:** Arthur A. Bakhtin. E-mail: lor-pathology@yandex.ru

**For citation:** Bakhtin A.A., Tumanova E.L. Cytokeratin expression in reactive cylindrical ciliated epithelium of the sinonasal tract in chronic inflammation. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):14–24 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.14-24.

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

**Received** 23.09.2022. **Received in revised form** 01.11.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

В настоящее время существует множество признанных гистологических градаций диспластических и реактивных состояний эпителиального пласта в слизистой оболочке верхних дыхательных путей, выстланных многослойным плоским неороговевающим эпителием [1], позволяющих проследить трансформацию эпителиального пласта от реактивных изменений через диспластические до опухолевых. Тем не менее пока еще крайне мало работ, посвященных изменению многоядного реснитчатого цилиндрического эпителия (МРЦЭ) области синоназального тракта при хронических воспалительных процессах.

В руководстве Д.И. Головина и И.В. Двораковской приводится классификация полипов: простые, сосудистые, железистые, переходноклеточные и эпидермоидные [2]. Сравнивая строение полипов, эти специалисты проследили, как изменяется структура эпителиального пласта и как в итоге вместо полипов начинают формироваться инвертированные папилломы. Согласно описанию, одна часть полипов покрыта дифференцированным МРЦЭ, другая может быть представлена многослойным плоским и переходным эпителием.

Изначально термин «переходный эпителий» в контексте верхних дыхательных путей является ошибочным. В принятой международной гистологической терминологии [3] переходным называют эпителий, выстилающий мочевого пузыря, мочеточники. Применительно к верхним дыхательным путям точнее говорить о транзитном эпителии как переходной форме от плюрипотентных базальных клеток через формирование регенерационной бластемы в более дифферен-

цированный респираторный или многослойный плоский. Еще в 1939 году В.Г. Гаршин [4] рассматривал транзитный эпителий как пример не метаплазии, а ателеплазии, то есть не дошедшей до конца дифференцировки. МРЦЭ, пройдя транзитную стадию в виде переходного эпителия, может подвергнуться истинной плоскоклеточной метаплазии. Таким образом, гистогенез переходного эпителия можно представить как незавершенную дифференцировку ателепластического эпителия. Появлению же регенерационной бластемы, то есть формированию ателепластического эпителия, должно предшествовать повреждение респираторного эпителия, например, при хроническом воспалительном процессе.

В пользу возможной трансформации воспалительных полипов в инвертированные папилломы говорят следующие гистологические находки: J.H. Yoon et al. [5], S. Kaza et al. [6] сообщают о сочетании клинических и патоморфологических признаков воспалительных полипов и инвертированных папиллом у пациентов, оперированных по поводу инвертированной папилломы, а W. Garavello и R.M. Gaini [7] проследили частоту гистологически подтвержденных инвертированных папиллом у пациентов, перенесших ранее повторные полипотомии носа.

В последние годы предпринята попытка показать роль воспалительного процесса в развитии инвертированных папиллом путем усиления пролиферации клеток покровного эпителия [8]. Существует ряд работ, демонстрирующих разницу в клинической и морфологической картине синоназальных папиллом и воспалительных полипов как двух самостоятельных несвязан-

ных нозологических единиц [9, 10]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о возможных изменениях эпителиальной выстилки синоназального тракта при хронических воспалительных процессах, в частности возможности воспалительных полипов трансформироваться в синоназальные папилломы через переходные формы изменений эпителиального пласта.

Одной из характеристик в оценке диспластических изменений эпителиального пласта дыхательного тракта является базальноклеточная гиперплазия, которая характеризуется наличием трех и более слоев базальных клеток вследствие их пролиферации [11, 12]. Цель нашего исследования – иммуногистохимическая характеристика пролиферативного потенциала и экспрессии различных цитокератинов покровного эпителия и на участках с базальноклеточной гиперплазией при хроническом неспецифическом воспалительном процессе.

## Материалы и методы

С учетом того, что неосложненные хронические воспалительные процессы синоназального тракта, как правило, лечат консервативно, наиболее доступной и удобной моделью для изучения изменений МРЦЭ является биопсийный материал, полученный от пациентов с диагнозами «полипозный риносинусит» и «воспалительный полип». Объектом исследования являлся операционный материал, полученный от 567 пациентов за период 2019–2022 годов (мужчины:женщины – 1,4:1, диапазон возраста 31–64 лет, медиана 48 лет). Основной жалобой пациентов было затрудненное носовое дыхание. Во всех случаях от пациентов получено письменное информированное согласие на участие в научно-исследовательской работе. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 12 часов с дальнейшим изготовлением парафиновых блоков по стандартной методике. С помощью микротомы Thermo Scientific HM 340E (Thermo Scientific, США) получали серийные срезы толщиной 5–6 мкм, монтировали их на стекла с адгезивным покрытием (Menzel, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином Y по стандартному протоколу. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проведено в 20 случаях. ИГХ исследование выполнено автоматизированным методом на иммуногистостейнере Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием системы визуализации ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc., США). Используются следующие моноклональные антитела: Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания), Stathmin (клон EP247, Epitomics, США), Cytokeratin 7 (клон RN7, Dako, Дания), Cytokeratin 10/13 (клон DE-K13, Dako, Дания), Cytokeratin 14 (клон LL002, Dako, Дания), Cytokeratin 17 (клон E-3, Dako, Дания), Cytokeratin 18 (клон DC 10, Dako, Дания), Cytokeratin 19 (клон RCK108, Dako, Дания). Все антитела были представлены в виде концентратов и разведены согласно инструкции производителя.

ИГХ реакцию с различными цитокератинами оценивали качественно («–» отрицательная реакция, «+» положительная реакция). На участках эпителиального пласта с положительной реакцией также оценивали интенсивность экспрессии полуколичественным методом: слабая, умеренная и выраженная интенсивность окрашивания.

Индекс пролиферативной активности (Ki-67) определяли, вычисляя соотношение окрашенных и неокрашенных ядер на 500 клеток в пяти репрезентативных полях зрения при  $\times 400$  [13]. Для оценки реакции с антителами к Stathmin определяли процент клеток с цитоплазматическим окрашиванием на 500 клеток в пяти полях зрения при  $\times 400$ .

Статистический анализ цифровых показателей выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Данные были представлены в виде медианы (Me) и квартилей ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Оценку достоверности различий проводили с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса, z-теста с поправкой на множественные сравнения. Для оценки взаимосвязи между пролиферативной активностью и экспрессией Stathmin применялся корреляционный анализ Спирмена. Различия между показателями считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

При рутинном окрашивании гематоксилином и эозином в 74% случаев ( $n=419$ ) отмечалась разной степени выраженности базальноклеточная гиперплазия, в 13% ( $n=73$ ) базальноклеточная гиперплазия сочеталась с очагами плоскоклеточной метаплазии. Проведенный анализ позволил выделить четыре морфологических варианта изменений эпителиального пласта синоназального тракта при хроническом воспалении.

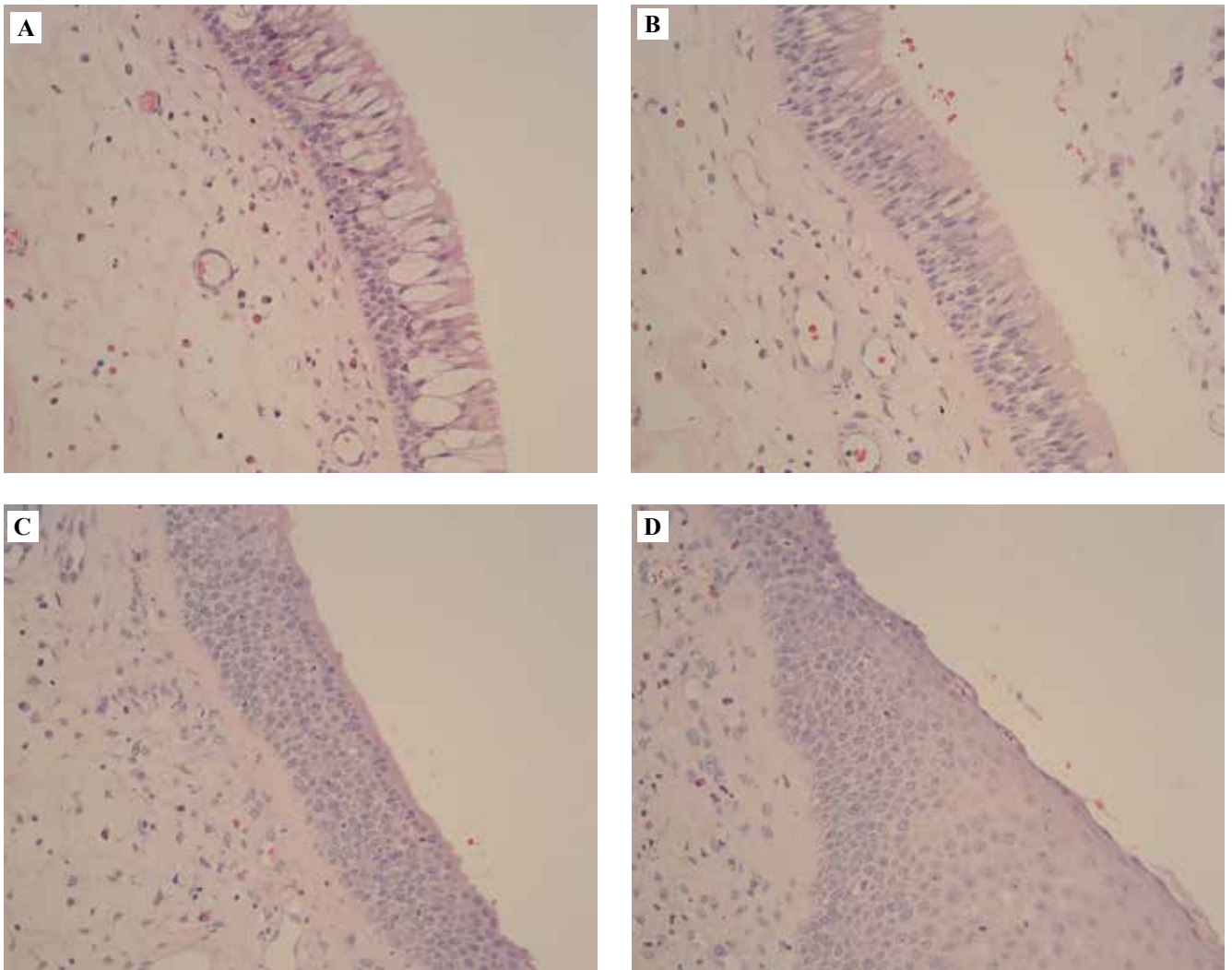
1. Слабо выраженная гиперплазия базальных клеток (рис. 1 А).
2. Умеренно выраженная гиперплазия базальных клеток (рис. 1 В).
3. Выявленная гиперплазия базальных клеток (рис. 1 С).
4. Участки плоскоклеточной метаплазии (рис. 1 D).

Наибольший интерес представляла выраженная гиперплазия базальных клеток, которая, по нашему мнению, может быть потенциальной зоной для формирования синоназальных папиллом и других эпителиальных опухолей синоназального тракта.

При светооптическом исследовании в МЦРЭ синоназального тракта на большем протяжении можно различить четыре основных типа клеток: базальные, вставочные, реснитчатые, бокаловидные. Экспрессия цитокератинов (рис. 2) для данного вида эпителия представлена в таблице 1.

Участки МРЦЭ со слабо выраженной гиперплазией базальных клеток характеризовались сохранением основных клеточных компонентов эпителиального пласта, свойственных респираторному эпителию:





*Рис. 1.* Разная степень выраженности базальноклеточной гиперплазии покровного эпителия синоназального тракта при хронических неспецифических воспалительных процессах.  
 А – слабо выраженная, В – умеренно выраженная, С – выраженная, D – плоскоклеточная метаплазия. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 200$

*Fig. 1.* Basal cell hyperplasia of various severity in the sinonasal tract epithelium in chronic nonspecific inflammation.  
 A – mild, B – moderate, C – severe, D – squamous metaplasia. H&E stain,  $\times 200$

*Таблица 1 | Table 1*

**Распределение различных типов цитокератинов в многоярком реснитчатом цилиндрическом эпителии |  
 Cytokeratin distribution in pseudostratified columnar ciliated epithelium**

Тип клеток   Cell type	CK7	CK10/13	CK14	CK17	CK18	CK19
Базальные   Basal cells	–	–	–	+	+	+
Вставочные   Intermediate cells	+	–	–	–	+	+
Бокаловидные   Goblet cells	+	–	–	–	+	+
Реснитчатые   Ciliated cells	+	–	–	–	+	+

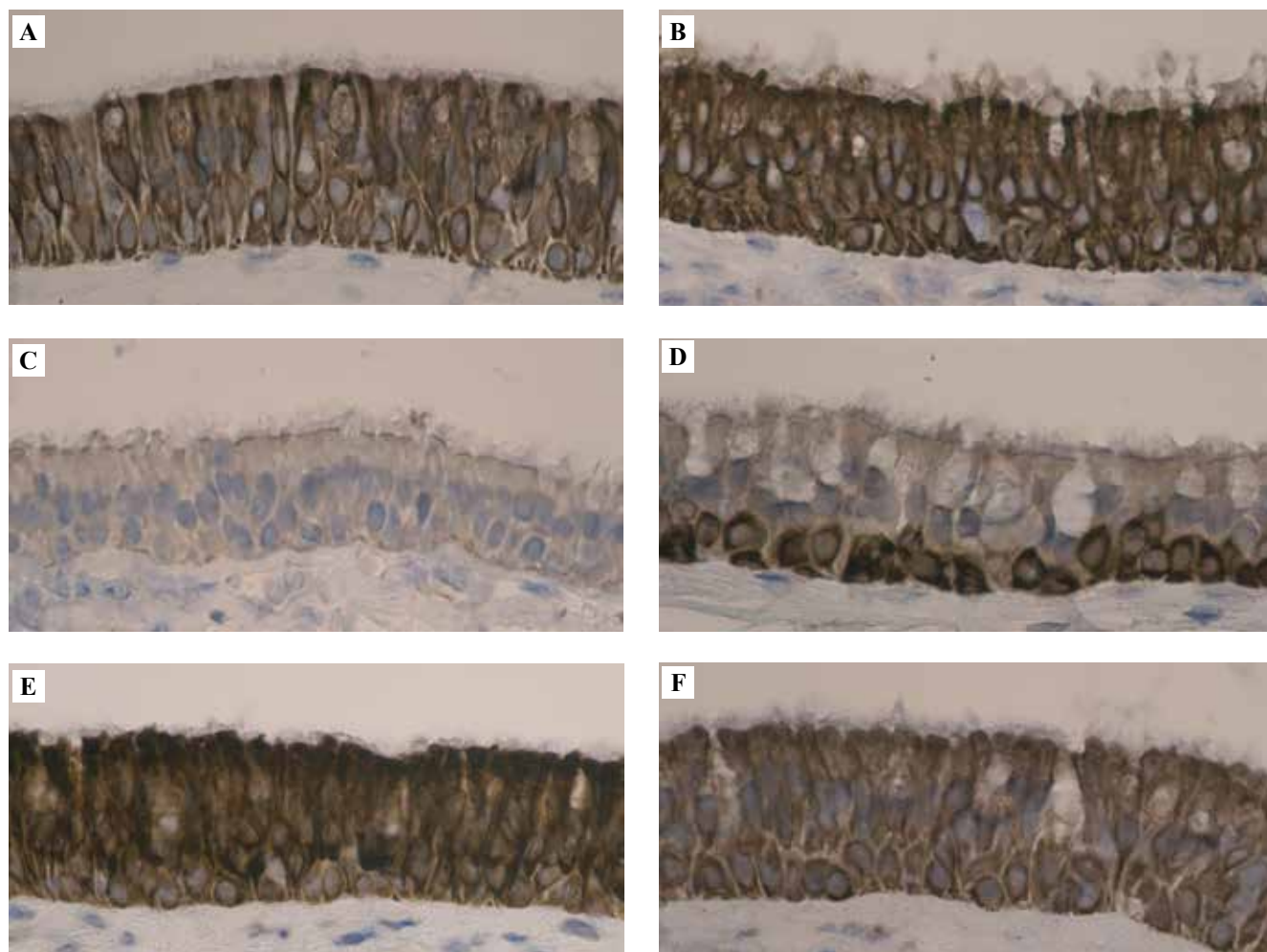


Рис. 2. Распределение разных типов цитокератинов в многорядном реснитчатом цилиндрическом эпителии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к СК 7 (А), СК 8 (В), СК 14 (С), СК17 (D), СК18 (Е), СК19 (F).  $\times 400$

Fig. 2. Distribution of various cytokeratin types in stratified ciliated columnar epithelium. IHC assay with antibodies to CK 7 (A), CK 8 (B), CK 14 (C), CK17 (D), CK18 (E), and CK19 (F).  $\times 400$

базальные, парабазальные и реснитчатые клетки, но с визуальным увеличением количества и объема бокаловидных клеток и незначительным увеличением количества базальных эпителиоцитов, составляющих не более 1/3 от толщины эпителиального пласта. Показатели пролиферативной активности (индекс Ki-67) эпителиального пласта на всех участках гиперплазии не отличались от показателей неизмененного эпителия и варьировали от 1 до 3%, Me=2 (табл. 2). Цитокератиновые профили участков со слабо выраженной гиперплазией базальных клеток и неизмененного эпителия практически не различались.

В МРЦЭ с умеренной гиперплазией базальных клеток реснитчатые эпителиоциты сохранялись, однако значительно снижалось количество бокаловидных клеток. Слой базальных клеток составлял уже 2/3 от общей толщины эпителиального пласта. Отмечались фокальные участки (так называемые горячие точки) статистически не значимого увеличения числа Ki-67 поло-

жительных клеток по сравнению с участками МРЦЭ без визуальных признаков базальноклеточной гиперплазии (рис. 3 А). Проллиферативный индекс составлял от 1 до 4%, Me=2 (табл. 2). На участках с выраженной гиперплазией базальных клеток выявлено полное отсутствие бокаловидных клеток. Реснитчатые эпителиоциты сохранялись, при этом их ядра были смещены к апикальному полюсу клетки. Базальные эпителиоциты замещали практически всю толщу эпителиального пласта.

На участках с выраженной гиперплазией базальных клеток выявлялось резкое повышение пролиферативной активности со значениями от 80 до 95%, Me=89,5 (рис. 3 В, табл. 2). При этом Ki-67 позитивные клетки занимали всю толщу эпителиального пласта. Участки плоскоклеточной метаплазии характеризовались полным замещением многорядного цилиндрического реснитчатого эпителия на многослойный плоский неороговевающий с отличающейся его гистоархитектоникой.

Таблица 2 | Table 2

**Уровень пролиферативного потенциала по Ki-67 и экспрессии Stathmin на различных участках МЦРЭ с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией | The level of proliferative potential for Ki-67 and Stathmin expression in different areas of pseudostratified ciliated columnar epithelium with basal cell hyperplasia and squamous metaplasia**

Группы   Groups	Проллиферативный потенциал по Ki-67   Proliferative potential by Ki-67 Me (Q1; Q3)	Значения экспрессии Stathmin   Stathmin expression values Me (Q1; Q3)
Слабо выраженная ГБК   Mild BCH (n=20) 1	2,00 (1,5; 2,5)	9,50 (9,0; 11,0)
Умеренно выраженная ГБК   Moderate BCH (n=20) 2	2,00 (1,0; 3,0)	9,00 (8,5; 10,5)
Выраженная ГБК   Severe BCH (n=20)	89,50 (87,5; 93,0)	93 (89; 95)
Плоскоклеточная метаплазия   Squamous metaplasia (n=20) 3	10,00 (9,0; 11,5)	20,50 (18,0; 24,0)
Тест Краскела–Уоллиса   Kruskal–Wallis test (n=80) 4	H=67,65 p<0,001	H= 67,11 p<0,001
p-значение попарных сравнений z-тестом с поправкой на множественные сравнения   p-value of pairwise comparisons by z-test adjusted to multiple comparisons	P <sub>1-2</sub> = 1,00 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>1-4</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> <0,001 P <sub>2-4</sub> <0,001 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> = 1,00 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>1-4</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> <0,001 P <sub>2-4</sub> <0,001 P <sub>3-4</sub> <0,05

ГБК – гиперплазия базальных клеток. p<0,05 – статистически значимые различия | BCH – basal cell hyperplasia. p<0.05 – statistically significant differences

В зонах с плоскоклеточной метаплазией Ki-67-позитивные клетки располагались в базальном слое метаплазированного эпителия, пролиферативный индекс составлял от 6 до 14%, Me=10 (табл. 2, рис. 3 С).

Цитоплазматическая экспрессия Stathmin возрастала по мере увеличения выраженности гиперплазии, как и индекс пролиферативной активности по Ki-67 (табл. 2, рис. 3 D–F).

Наиболее высокая экспрессия Stathmin (Me=93,0 [89,0; 95,0]) отмечалась на участках с выраженной базальноклеточной гиперплазией (табл. 2, рис. 3 E). Данная зона обладала наибольшей пролиферативной активностью по Ki-67, достигая практически от 80 до 95% (Me=89,50 [87,5; 93,0]), что также коррелирует с повышенной цитоплазматической экспрессией Stathmin (Me=93,0 [89,0; 93,0]) (коэффициент Спирмена, r=0,54; p=0,005).

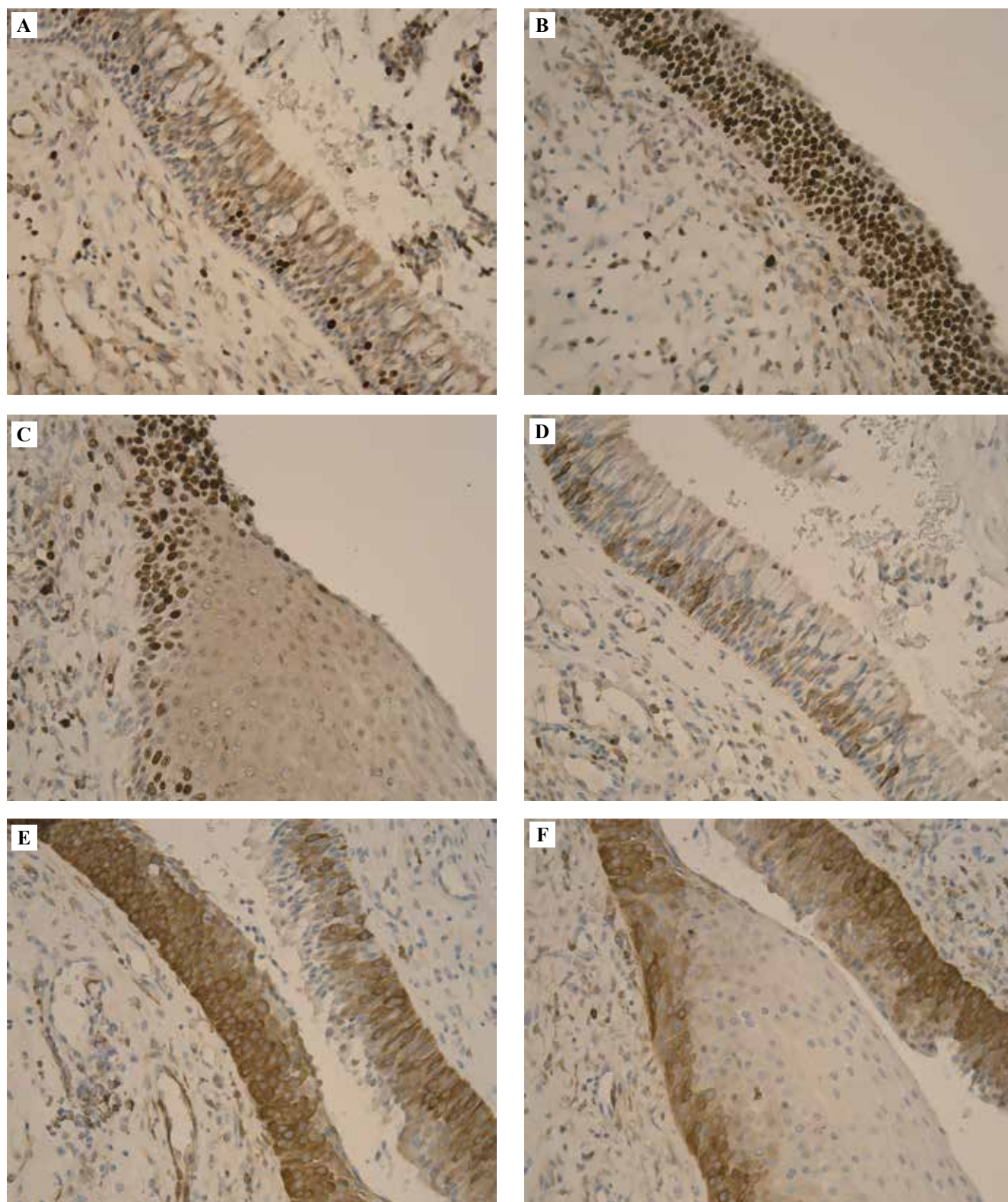
В норме Cytokeratin 7 экспрессируется во всех клетках эпителиального пласта МЦРЭ, за исключением базальных эпителиоцитов. На участках с умеренной и выраженной гиперплазией базальных клеток отмечалась гиперплазия иммунонегативных базальных эпителиоцитов (рис. 4 А). Участок плоскоклеточной

метаплазии также на всем протяжении был иммунонегативен к данному маркеру.

МЦРЭ проявлял негативную реакцию с антителами к Cytokeratin 10/13. Однако на участке с выраженной гиперплазией базальных клеток отмечалось появление групп эпителиоцитов с иммунопозитивной реакцией на Cytokeratin 10/13 (рис. 4 В). Экспрессия данного маркера носила неравномерный характер, наиболее интенсивную реакцию наблюдали в клетках парабазального и поверхностного слоев эпителиального пласта. Участки плоскоклеточной метаплазии были иммунопозитивны к Cytokeratin 10/13, за исключением базальных клеток.

На участках со слабой и умеренной гиперплазией базальных клеток МЦРЭ на всем протяжении не давал реакции с антителами к Cytokeratin 14. При этом его экспрессия проявлялась в группе с выраженной гиперплазией базальных клеток (рис. 4 С), а также по всей толщине метаплазированного эпителия.

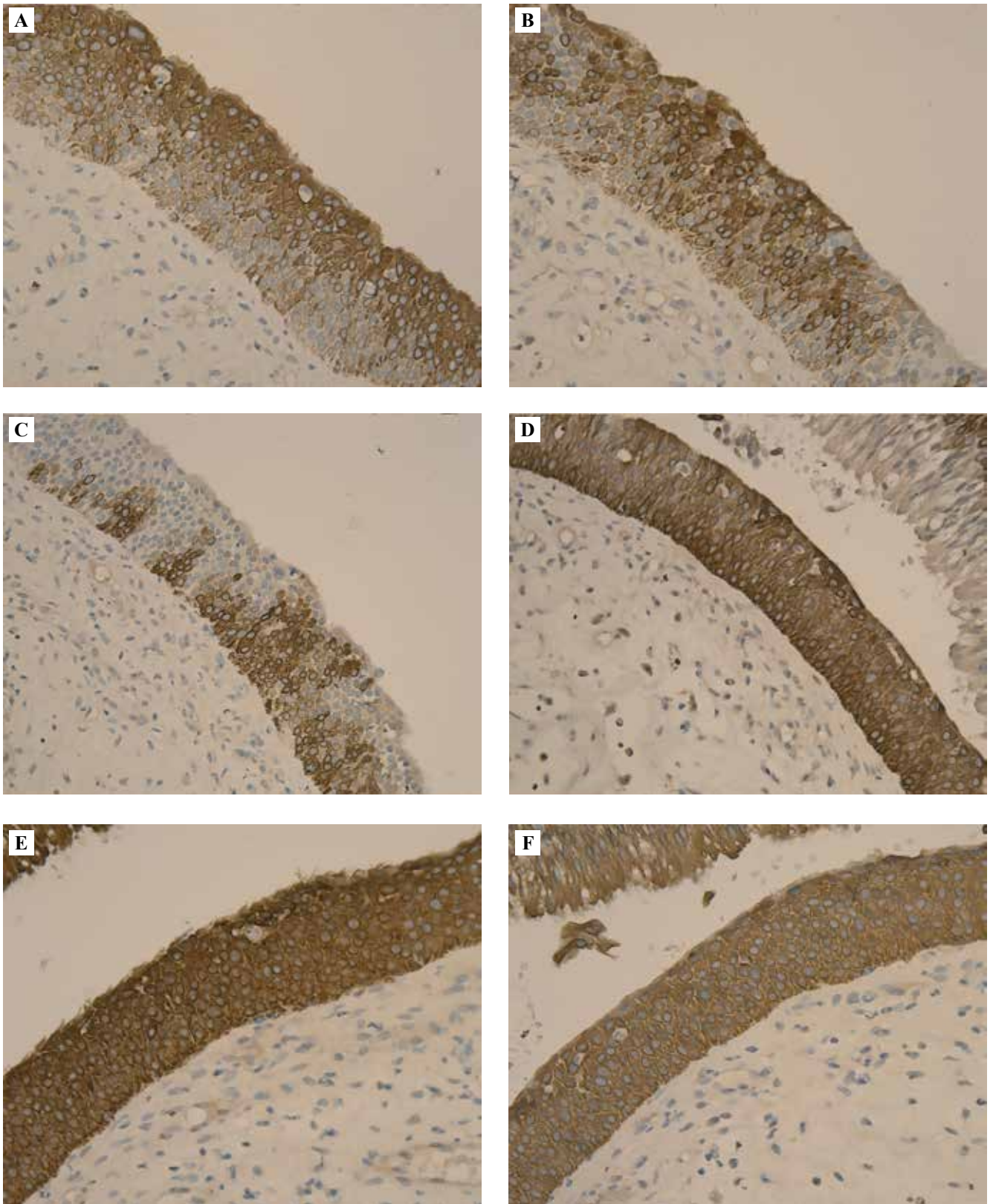
В базальных клетках респираторного эпителия проявлялась яркая ИГХ реакция с антителами к Cytokeratin 17. На участках с выраженной гиперплазией



*Рис. 3.* Распределение Ki-67 и Stathmin в эпителиальном пласте синоназального тракта при хронических воспалительных процессах. А, D – зоны эпителиального пласта с картиной умеренной гиперплазии базальных клеток. В, Е – зоны эпителиального пласта с картиной выраженной гиперплазии базальных клеток. С, F – зоны эпителиального пласта с картиной плоскоклеточной метаплазии. ИГХ окрашивание с антителами к Ki-67 (А–С) и Stathmin (D–F). ×200

*Fig. 3.* Ki-67 and Stathmin expression in the epithelial layer of the sinonasal tract in chronic inflammatory processes.

A, D – the epithelial layer with moderate hyperplasia of basal cells. B, E – the epithelial layer with a pattern of severe hyperplasia of basal cells. C, F – the epithelial layer with squamous metaplasia. A–C – IHC assay with antibodies to Ki-67 (A–C) and Stathmin (D–F). ×200



*Рис. 4.* Экспрессия цитокератинов на участках с картиной выраженной гиперплазии базальных клеток МРЦЭ.

ИГХ окрашивание с антителами к СК 7 (А), СК 10/13 (В), СК 14 (С), СК17 (D), СК18 (E), СК19 (F). ×400

*Fig. 4.* Cytokeratin expression in the areas with severe basal cell hyperplasia in the pseudostratified columnar ciliated epithelium.

IHC assay with antibodies to CK 7 (A), CK 10/13 (B), CK 14 (C), CK17 (D), CK18 (E), and CK19 (F). ×400

базальных клеток, а также в зонах с плоскоклеточной метаплазией эпителиальный пласт был иммунопозитивен по всей толще, с незначительным ослаблением интенсивности реакции на участках с плоскоклеточной метаплазией (рис. 4 D).

Во всем эпителиальном пласте многорядного цилиндрического реснитчатого эпителия с любой выраженностью базальноклеточной гиперплазии наблюдали интенсивную ИГХ реакцию на Cytokeratin 18 (рис. 4 E). На участках плоскоклеточной метаплазии отмечали снижение интенсивности реакции с сохранением очагов полигональной формы с более выраженной экспрессией Cytokeratin 18.

Экспрессия Cytokeratin 19 также выявлена во всем эпителиальном пласте многорядного цилиндрического реснитчатого эпителия. На участках плоскоклеточной метаплазии наблюдали общее снижение интенсивности реакции с сохранением очагов полигональной формы с более выраженной экспрессией Cytokeratin 19, расположенных, как правило, парабазально (рис. 4 F).

## Обсуждение

Наше исследование показывает, что эпителиальная выстилка синоназального тракта при хроническом неспецифическом воспалительном процессе может иметь различную степень выраженности гиперплазии базальных клеток. Границы между указанными зонами, как правило, были четкие. Установлено, что зона выраженной гиперплазии базальных клеток практически полностью утрачивает citoархитектонику эпителиального пласта, свойственную эпителиальной выстилке синоназального тракта. При ИГХ исследовании в этих зонах по всей толще эпителиального пласта выявлено изменение цитокератинового профиля по сравнению с нормальным покровным эпителием полости носа и околоносовых пазух, который отличался повышенной экспрессией цитокератина 5, типичной для базальных клеток, и цитокератина 10/13, характерной для клеток плоского эпителия.

Stathmin – эволюционно консервативный белок, участвующий в регулировке динамики микротрубочек, необходимый в том числе и для формирования веретен деления, участвующих в митозе. Воздействуя на баланс сборки и дезинтеграции микротрубочек, Stathmin регулирует процессы быстрой перестройки цитоскелета в ответ на внешние факторы. Нарушение экспрессии Stathmin может привести к непрекращающейся сборке митотических веретен и, как следствие, бесконтрольному клеточному циклу [14].

В результате корреляционного анализа в группе с выраженной гиперплазией базальных клеток была получена достоверная связь между показателями Ki-67 и Stathmin. Связь оказалась прямой и положительной. При увеличении показателя Ki-67 показатель Stathmin также будет увеличиваться. Корреляцию данных маркеров подтверждают и другие исследования [15].

Таким образом, переходный эпителий (устоявшийся термин) есть не что иное, как многорядный цилиндрический реснитчатый эпителий с выраженной базальноклеточной гиперплазией.

Ранее в экспериментальных работах было показано, что респираторный эпителий верхних дыхательных путей в ответ на стрессорные воздействия внешней среды, в частности табачного дыма, способен менять экспрессию цитокератинов, в том числе с появлением цитокератинового профиля, свойственного многослойному плоскому эпителию [16]. По данным нашего исследования, одновременная экспрессия цитокератинов, характерных как для однослойного, так и для многослойного эпителия, на участках с выраженной гиперплазией базальных клеток свидетельствует о возможной дивергентной дифференцировке и позволяет рассматривать данную область как наиболее вероятную для развития эпителиальных опухолей синоназального тракта, в том числе различных типов синоназальных папиллом (рис. 5). Такой вывод подтверждается результатами ранее опубликованных работ, где на основании ИГХ анализа цитокератинового профиля показано, что инвертированная папиллома по сравнению с нормальным поверхностным эпителием полости носа и околоносовых пазух проявляет повы-

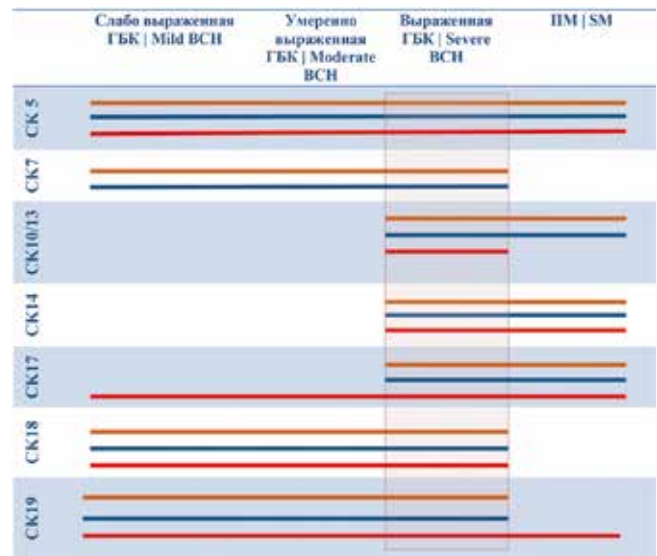


Рис. 5. Экспрессия цитокератинов на разных участках реактивно измененного многорядного реснитчатого цилиндрического эпителия.

ГБК – гиперплазия базальных клеток.

ПМ – плоскоклеточная гиперплазия

нижняя треть эпителиального пласта – —

средняя треть эпителиального пласта – —

верхняя треть эпителиального пласта – —

Fig. 5. Cytokeratin expression in various areas of reactively altered ciliated columnar epithelium.

BCH – basal cell hyperplasia. SM – squamous metaplasia

lower third of the epithelial layer – —

middle third of the epithelial layer – —

higher third of the epithelial layer – —

шенную экспрессию цитокератина 5, характерную для базальных клеток, и цитокератина 10/13, свойственную клеткам плоского эпителия [17, 18].

Полипозный риносинусит, как хронический воспалительный процесс, в данном случае может выступать в роли пускового фактора в развитии синоназальных папиллом. Такого же мнения придерживается ряд авторов, предположивших, что инвертированные папилломы возникают на фоне хронического воспалительного процесса [19]. Так, было показано, что пациенты с односторонним распространением инвертированной папилломы имели более выраженный контрлатеральный синусит в сравнении с группой пациентов без инвертированной папилломы [20].

Несмотря на изложенное выше, открытым остается вопрос, какие конкретно факторы определяют тот или иной путь дифференцировки эпителия, что в конечном счете приводит либо к регенерации эпителиального пласта, либо к формированию плоскоклеточной метаплазии, либо к различным эпителиальным опухолям.

## Заключение

При хроническом неспецифическом воспалительном процессе в слизистой оболочке синоназального тракта наблюдались участки эпителиальной выстилки с атипичной гистоархитектоникой, представленной группами базальных клеток, занимающих всю толщу эпителиального пласта, которые обладают высокой пролиферативной активностью и одновременной экспрессией цитокератинов, характерных как для однослойного, так и для многослойного эпителия. Это позволяет рассматривать данную область как наиболее вероятную для развития разных эпителиальных опухолей синоназального тракта, в том числе различных типов синоназальных папиллом.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Бахтин.  
Сбор и обработка материала – А.А. Бахтин.  
Написание текста – А.А. Бахтин.  
Редактирование – Е.Л. Туманова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.A. Bakhtin.  
Collected the data and performed the analysis – A.A. Bakhtin.  
Wrote the paper – A.A. Bakhtin.  
Edited the manuscript – E.L. Tumanova.

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

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

## Литература/References

- AK El-Naggar, JKC Chan, JR Grandis, T Takata, PG Slootweg (eds.). WHO classification of head and neck tumors. 4th ed. Lyon: IARC, 2017. P. 266–268.
- Головин Д.И., Двораковская И.В. Опухоли носа и придаточных пазух (Вопросы гистологии и гистогенеза). Ленинград: Медицина, 1972. 96 с.
- Golovin DI, Dvorakovskaya IV. Tumors of the nose and paranasal sinuses: Questions of histology and histogenesis. Leningrad: Medicine, 1972. 96 p. (In Russ.).
- В.В. Банин, В.Л. Быкова (ред.). Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. Москва: ГЭОТАР Медиа, 2009. 272 с.
- VV Banin, VL Bykova (eds.). International terms on cytology and histology of a person with an official list of Russian equivalents. Moscow: GEOTAR Media, 2009. 272 p. (In Russ.).
- Гаршин В.Г. Воспалительные разрастания эпителия, их биологическое значение и отношение к проблеме рака. Москва–Ленинград: Медицина, 1939. 132 с.
- Garshin VG. Inflammatory epithelial growths, their biological significance and relation to the problem of cancer. Moscow–Leningrad: Medicine, 1939. 132 p. (In Russ.).
- Yoon JH, Kim CH, Choi EC. Treatment outcomes of primary and recurrent inverted papilloma: An analysis of 96 cases. J Laryngol Otol. 2002;116(9):699–702. DOI: 10.1258/002221502760237984.
- Kaza S, Capasso R, Casiano RR. Endoscopic resection of inverted papilloma: University of Miami experience. Am J Rhinol. 2003;17(4):185–90. DOI: 10.1177/194589240301700402.
- Garavello W, Gaini RM. Incidence of inverted papilloma in recurrent nasal polyposis. Laryngoscope. 2006;116(2):221–3. DOI: 10.1097/01.mlg.0000191469.79374.57.
- Wang H, Zhou J, Shi L, Zhang C, Li W, Hu L et al. Increased neutrophil infiltration and epithelial cell proliferation in sinonasal inverted papilloma compared to contralateral nasal polyps. Am J Rhinol Allergy. 2022;36(5):583–90. DOI: 10.1177/19458924221091691.
- Li X, Zhao H, Ren T, Tian Y, Yan A, Li W. Inverted papilloma and nasal polyp classification using a deep convolutional network integrated with an attention mechanism. Comput Biol Med. 2022;149:105976. DOI: 10.1016/j.compbimed.2022.105976.
- Sano N, Kikuta S, Kondo K, Yamasoba T. High CT values relative to the brainstem differentiate inverted papillomas from nasal polyps. Auris Nasus Larynx. 2021;48(5):905–13. DOI: 10.1016/j.anl.2021.02.011.
- Pankova OV, Tashireva LA, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Pismenny DS et al. Premalignant changes in the bronchial epithelium are prognostic factors of distant metastasis in non-small cell lung cancer patients. Front Oncol. 2021;11:771802. DOI: 10.3389/fonc.2021.771802.
- Gnepp DR, Bishop JA. Gnepp's Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 3rd ed. Elsevier, 2020. 1216 p. DOI: 10.1016/C2015-0-05623-4.
- Г.А. Франк, Л.Э. Завалишина, Ю.Ю. Андреева (ред.). Рак молочной железы. Морфологическая диагностика и генетика: Руководство для врачей. 2-е изд. Москва: Практическая медицина, 2021. 240 с.
- GA Frank, LE Zavalishina, YuYu Andreeva (eds.). Breast cancer. Morphological diagnostics and genetics: A guide for physicians. 2nd ed. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2021. 240 p. (In Russ.).
- Rubin CI, Atwen GF. The role stathmin in the regulation of the cell cycle. J Cell Biochem. 2004;93(2):242–50. DOI: 10.1002/jcb.20187.

15. Schmitt S, Safferling K, Westphal K, Hrabowski M, Müller U, Angel P et al. Stathmin regulates keratinocyte proliferation and migration during cutaneous regeneration. *PLoS One*. 2013;8(9):e75075. DOI: 10.1371/journal.pone.0075075.
16. Schlage WK, Büllens H, Friedrichs D, Kuhn M, Teredesai A, Terpstra PM. Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. II. Changes in cytokeratin expression patterns following 8-day exposure to room-aged cigarette sidestream smoke. *Toxicol Pathol*. 1998;26(3):344–60. DOI: 10.1177/019262339802600308.
17. Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K, Maier H. Coexpression of cytokeratins typical for columnar and squamous differentiation in sinonasal inverted papillomas. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(5):747–54. DOI: 10.1309/TH5J-T1Q6-9QJR-8CDK.
18. Plinkert PK, Ruck P, Baumann I, Scheffler B. Inverted papilloma of the nose and paranasal sinuses – diagnosis, surgical procedure and studies of cytokeratin profile. *Laryngorhinootologie*. 1997;76(4):216–24. DOI: 10.1055/s-2007-997415.
19. Roh HJ, Procop GW, Batra PS, Citardi MJ, Lanza DC. Inflammation and the pathogenesis of inverted papilloma. *Am J Rhinol*. 2004;18(2):65–74. PMID: 15152870.
20. Papagiannopoulos P, Tong CL, Kuan EC, Tajudeen BA, Yver CM, Kohanski M et al. Inverted papilloma is associated with greater radiographic inflammatory disease than other sinonasal malignancy. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(3):278–81. DOI: 10.1002/alr.22484.

### Информация об авторах

Артур Александрович Бахтин – кандидат медицинских наук, заведующий отделением патологической анатомии органов головы и шеи НМИЦ оториноларингологии ФМБА России.

Елена Леонидовна Туманова – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### Author information

Arthur A. Bakhtin – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathological Anatomy of the Head and Neck, National Medical Research Center for Otorhinolaryngology.  
<https://orcid.org/0000-0003-0232-0545>

Elena L. Tumanova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathological Anatomy and Clinical Pathological Anatomy, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-1149-4061>



## Особенности распространения опухоли по воздушным пространствам у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

*М.В. Завьялова<sup>1,2</sup>, Д.М. Лоос<sup>2</sup>, Д.С. Письменный<sup>1,2</sup>, А.А. Дурова<sup>2</sup>, Е.С. Андрюхова<sup>2</sup>,  
Е.О. Родионов<sup>1</sup>, С.В. Миллер<sup>1</sup>, С.А. Тузиков<sup>1,2</sup>, Л.А. Таширева<sup>1</sup>, О.В. Панкова<sup>1</sup>, В.М. Перельмутер<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Научно-исследовательский институт онкологии, Томск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

**Резюме. Введение.** В настоящее время молекулярные механизмы, лежащие в основе развития STAS – маркера неблагоприятного исхода рака легких, остаются до конца не изученными. Не исключено, что развитие STAS может быть ассоциировано с маркерами высокого риска гематогенного метастазирования и рецидивирования – изменениями бронхиального эпителия. Цель исследования – изучить особенности STAS у пациентов с разными морфологическими изменениями бронхиального эпителия бронхов. **Материалы и методы.** Исследовали операционный материал от 90 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), проходивших лечение в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2009 по 2017 год. Все пациенты получали комбинированное лечение. Анализировали истории болезни и амбулаторные карты пациентов. Распространенность заболевания определялась согласно Международной классификации по системе TNM 2017 года. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике. Гистологический тип рака определялся согласно классификации ВОЗ 2015 года. В исследование были включены только случаи с НМРЛ, а именно с плоскоклеточным раком (n=50) или аденокарциномой (n=40). В лимфатических узлах оценивали наличие метастатического поражения, подсчитывали число лимфоузлов с метастазами. В слизистой оболочке бронхов, располагающихся на 3–4 см от границы опухоли, оценивали наличие изменений бронхиального эпителия. Учитывали информацию о наличии, сроках и локализации гематогенных метастазов и рецидивов. Применялись методы описательной статистики. Обсуждались результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Проведенное исследование позволило выявить ряд закономерностей, которые могут дополнить представления о патогенезе такой формы прогрессии новообразования, актуальной для рака легкого, как распространение опухоли по воздушным пространствам.

**Заключение.** Исходя из полученных данных, обнаружение STAS предлагается рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, связанный с риском локорегионарного метастазирования.

**Ключевые слова:** STAS, немелкоклеточный рак легкого, регенераторная гиперплазия бронхиального эпителия, метаплазия бронхиального эпителия, метастазирование

**Для корреспонденции:** Марина Викторовна Завьялова. E-mail: zavyalovamv@mail.ru

**Для цитирования:** Завьялова М.В., Лоос Д.М., Письменный Д.С., Дурова А.А., Андрюхова Е.С., Родионов Е.О., Миллер С.В., Тузиков С.А., Таширева Л.А., Панкова О.В., Перельмутер В.М. Особенности распространения опухоли по воздушным пространствам у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):25–35. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.25-35.

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

Статья поступила 17.05.2022. Получена после рецензирования 16.09.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## Features of tumor spread through the air spaces in patients with non-small cell lung carcinoma

*M.V. Zavyalova<sup>1,2</sup>, D.M. Loos<sup>2</sup>, D.S. Pismenny<sup>1,2</sup>, A.A. Durova<sup>2</sup>, E.S. Andryukhova<sup>2</sup>,  
E.O. Rodionov<sup>1</sup>, S.V. Miller<sup>1</sup>, S.A. Tuzikov<sup>1,2</sup>, L.A. Tashireva<sup>1</sup>, O.V. Pankova<sup>1</sup>, V.M. Perelmuter<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

**Abstract. Introduction.** To date, the molecular mechanisms underlying the development of STAS remain poorly understood. The development of STAS – a marker of an unfavorable outcome of lung cancer – is likely to be associated with markers of a high risk of hematogenous metastasis and recurrence, i.e., changes in the bronchial epithelium. The paper aimed to study the features of STAS in patients with different morphological changes in the bronchial epithelium.

*Materials and methods.* We studied surgical material from 90 patients with non-small cell lung cancer who received combined treatment in the thoracoabdominal department of the Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center between 2009 and 2017. Case histories and outpatient cards of patients were analyzed. We determined the prevalence of the disease according to the international classification using the TNM staging system (2017). We used the standard method to post the material and manufacture histological preparations. The 2015 WHO classification was used to determine the histological type of cancer. The study included only cases with non-small cell lung carcinoma, namely squamous cell carcinoma (n=50) or adenocarcinoma (n=40). In the lymph nodes, we assessed the presence of metastatic lesions and counted the number of lymph nodes with metastases. In the bronchial mucosa located 3–4 cm from the border of the tumor, we assessed the presence of changes in the bronchial epithelium. The information about the presence, timing, and location of hematogenous metastases and relapses was taken into account. We used descriptive statistics; the results were discussed with the statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

*Results.* We identified a number of patterns that could complement the understanding of SPAS pathogenesis, a form of tumor progression relevant for lung cancer.

*Conclusion.* We propose to consider the detection of STAS as an unfavorable prognostic sign associated with the risk of locoregional metastasis.

**Keywords:** STAS, non-small cell lung cancer, regenerative hyperplasia of the bronchial epithelium, metaplasia of the bronchial epithelium, metastasis

**Corresponding author:** Marina V. Zavyalova. E-mail: zavyalovamv@mail.ru

**For citation:** Zavyalova M.V., Loos D.M., Pismenny D.S., Durova A.A., Andryukhova E.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Tuzikov S.A., Tashireva L.A., Pankova O.V., Perelmuter V.M. Features of tumor spread through the air spaces in patients with non-small cell lung carcinoma. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):25–35 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.25-35.

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

**Received** 17.05.2022. **Received in revised form** 16.09.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

Распространение опухоли по воздушным пространствам – STAS (Spread Through Air Spaces) – является одной из форм прогрессии рака легкого. Термин STAS был сформулирован К. Kadota et al. в 2015 году [1]. В том же году Всемирная организация здравоохранения рекомендовала STAS в качестве гистологического критерия инвазии аденокарциномы легкого. Распространение опухоли по воздушным пространствам может наблюдаться и при плоскоклеточной карциноме легкого [2–4].

В настоящее время под термином STAS подразумевают наличие в просветах альвеол вблизи опухолевого узла солидных, микропапиллярных структур и единичных опухолевых клеток [5]. А. Warth et al. предложили выделять два варианта STAS: ограниченный и обширный. За ограниченный STAS принимали случаи, при которых в результате гистологического исследования было обнаружено не менее пяти опухолевых клеток, свободно лежащих в просветах альвеол, отстоящих от границ основного опухолевого узла на расстояние менее трех альвеол. Обширным STAS считали случаи, при которых гнезда опухолевых клеток свободно лежали в просвете альвеол на расстоянии более трех альвеол от границ основного опухолевого узла [6].

Имеются данные о том, что при обнаружении STAS у пациентов с аденокарциномой легкого после выполнения резекции чаще развиваются локорегиональные и отдаленные метастазы. При этом описываемый феномен не связан с рецидивированием и гематогенным

метастазированием, когда объем операции соответствует лобэктомии [7].

При плоскоклеточном раке легких обнаружение STAS ассоциировано с большей частотой локорегионального и отдаленного метастазирования. Однако данный феномен помогал предсказывать риск локорегионального и отдаленного метастазирования лишь у пациентов с I стадией рака легких и не имел значения при II и III стадиях процесса [3].

По мнению Т. Song et al., недостатком феномена STAS является невозможность оценки данного параметра при выполнении предоперационной биопсии ткани опухоли, тем не менее обнаружение STAS в операционном материале аденокарциномы легкого I стадии указывает на высокий риск локорегиональных рецидивов и отдаленного метастазирования и диктует необходимость выполнения адъювантной химиотерапии [8].

Пока молекулярные механизмы, лежащие в основе развития STAS, остаются до конца неизученными [9]. Обнаружено, что STAS связан с более низким уровнем экспрессии Е-кадгерина в клетках структур, распространяющихся по воздушным пространствам, и с более высоким уровнем экспрессии этого показателя в первичном опухолевом узле при плоскоклеточной карциноме легкого, что указывает на возможное наличие признаков эпителиально-мезенхиального перехода (ЭМП) [10]. Однако вопрос о вовлечении опухолевых клеток самих структур STAS в ЭМП остается спорным, поскольку они, по данным ряда исследований, экспрессируют Е-кадгерин [11]. Авторы делают вывод,

что ЭМП может быть фактором риска, но не механизмом STAS [10].

В смежной с первичной опухолью легочной ткани наблюдаются выраженные в разной степени проявления воспаления. В мелких бронхах воспаление сопровождается изменениями эпителия. К ним относят регенераторную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию слизистой оболочки бронхов, при этом самым ранним изменением эпителия является базальноклеточная гиперплазия, за ней следует развитие плоскоклеточной метаплазии [12–14].

Ранее было показано, что у пациентов с изолированной базальноклеточной гиперплазией в мелких бронхах, смежных с опухолью, чаще возникают гематогенные метастазы [15], а у пациентов с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии рецидивы опухолевого процесса [16]. Не исключено, что развитие STAS – маркера неблагоприятного исхода рака легких – может быть ассоциировано с маркерами высокого риска гематогенного метастазирования и рецидивирования – изменениями бронхиального эпителия. В связи с этим представляет интерес изучение особенностей STAS у пациентов с разными морфологическими изменениями бронхиального эпителия бронхов.

#### Материалы и методы

Изучен операционный материал от 90 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) T1–3N0–2M0, проходивших лечение в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2009 по 2017 год. Распространенность заболевания определялась согласно Международной классификации по системе TNM 8-го издания [17]. Объем операции соответствовал лобэктомии с ипсилатеральной медиастенальной лимфодиссекцией. Неоадьювантной химиотерапии и интраоперационной лучевой терапии не было. По показаниям пациентам выполнялась адьювантная терапия по следующим схемам: винорелбин, цисплатин (25–30 мг/м<sup>2</sup>

в 1-й и 8-й дни цикла, 75–80 мг/м<sup>2</sup> внутривенно в 1-й день цикла; цикл – 21 день) или паклитаксел, карбоплатин (200 мг/м<sup>2</sup> внутривенно в 1-й день цикла, внутривенно в 1-й день цикла; цикл – 21 день).

Материал фиксировали в 10–12% растворе нейтрального формалина. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическая оценка выполнялась с использованием светового микроскопа Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия) и сканирующего микроскопа Mirax Midi (Zeiss, Германия).

Гистотип опухоли устанавливался согласно классификации WHO (2015) [18]. В исследование включались только случаи с плоскоклеточной карциномой и аденокарциномой. Для верификации диагнозов «плоскоклеточная карцинома» и «аденокарцинома» выполнялось иммуногистохимическое исследование с использованием антител к Cytokeratine 7 (клон OV-TL 12/30, Novocastra, Leica Byosystems, Германия), TTF (клон SPT24, Novocastra, Leica Byosystems, Германия), Napsin A (клон NCL-L, Novocastra, Leica Byosystems, Германия), p63 (клон 7JUL, Novocastra, Leica Byosystems, Германия), Cytokeratine 5/6 (клон D5/16, Dako, Дания). Иммуногистохимическое исследование осуществлялось по стандартной методике. В случаях с аденокарциномой определялась позитивная экспрессия Cytokeratine 7, TTF, Napsin A и негативная экспрессия p63, Cytokeratine 5/6. В случаях с плоскоклеточной карциномой определялась позитивная экспрессия p63, Cytokeratine 5/6 и негативная экспрессия Cytokeratine 7, TTF, Napsin A. За феномен STAS принимали наличие в просветах альвеол вблизи опухолевого узла солидных, микропапиллярных структур и единичных опухолевых клеток. Определяли ограниченный STAS – на расстоянии менее трех альвеол от основного опухолевого узла (рис. 1 А) и обширный STAS – на расстоянии более трех альвеол (рис. 1 В) [19].

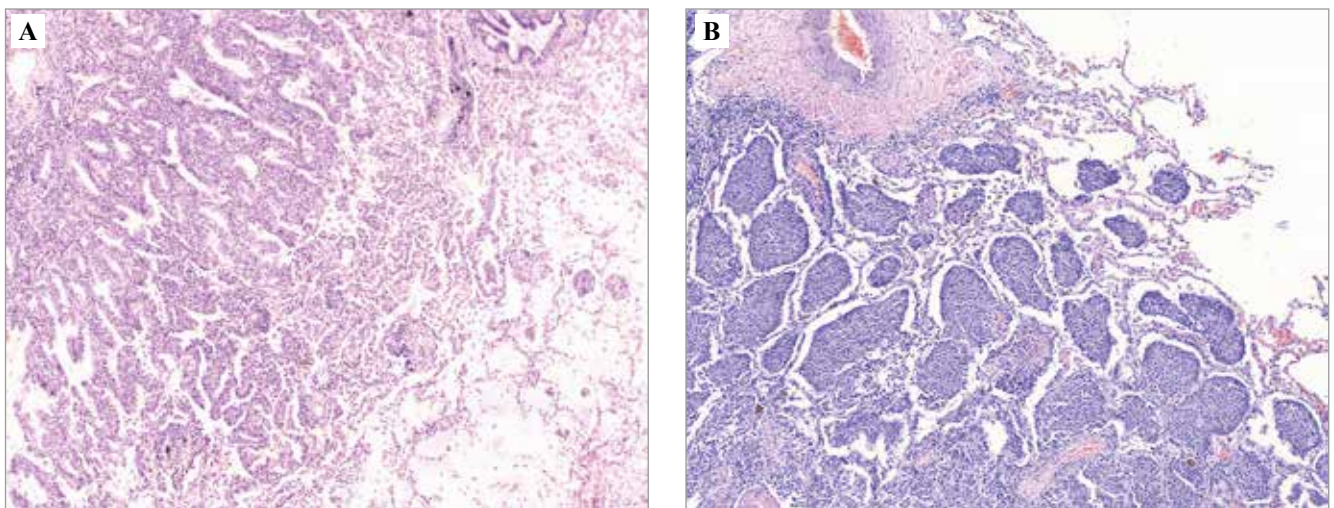


Рис. 1. Феномен STAS при аденокарциноме (А) и при плоскоклеточной карциноме (В). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$   
Fig. 1. The STAS phenomenon in adenocarcinoma (A) and squamous cell carcinoma (B). H&E stain,  $\times 100$

В лимфатических узлах оценивали наличие метастатического поражения, подсчитывали число лимфоузлов с метастазами.

В слизистой оболочке бронхов, располагающихся на 3–4 см от границы опухоли, оценивали наличие базальноклеточной гиперплазии (БКГ) и плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и их сочетания (рис. 2).

С учетом изменений, обнаруженных в бронхиальном эпителии, были сформированы три группы пациентов: 1-я – 17 пациентов без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ–ПМ–); 2-я – 45 пациентов с базальноклеточной гипер-

плазией, без плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ–); 3-я – 28 пациентов с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+).

Исследуемые группы не различались по возрасту, полу, локализации и размеру опухоли. В 44% случаев диагностирована аденокарцинома и в 56% плоскоклеточная карцинома. Срок наблюдения за пациентами составил 5 лет. Анализировали истории болезни и амбулаторные карты пациентов, учитывалась информация о наличии, сроках и локализации гематогенных метастазов и рецидивов. Характеристика исследуемых групп пациентов приведена в таблице.

Таблица | Table

Характеристика исследуемых групп пациентов | Characteristics of the patient groups

Параметр   Parameter	Исследуемые группы   Studied groups		
	1-я группа, БКГ–ПМ–   Group 1, BСH–SM– (n=17)	2-я группа, БКГ+   Group 2, BСH+ (n=45)	3-я группа, БКГ+ПМ+   Group 3, BСH+SM+ (n=28)
Возраст, лет   Age, years (Mean ± SD)	59,7±5,3	58,4±8,3	60,5±6,1
Пол   Sex			
• мужчины   male, n (%)	14 (82%)	36 (80%)	25 (89%)
• женщины   female, n (%)	3 (18%)	9 (20%)	3 (11%)
Локализация   Location			
• центральный   central	14 (82%)	30 (67%)	23 (82%)
• периферический   peripheral	3 (18%)	15 (33%)	5 (18%)
Стадия опухоли   Tumor stage			
• T1	7 (42%)	14 (31%)	8 (29%)
• T2	5 (29%)	16 (36%)	14 (50%)
• T3	5 (29%)	15 (33%)	6 (21%)
Гистологический тип   Histological type			
• аденокарцинома   adenocarcinoma	11 (65%)	19 (42%)	10 (36%)
• плоскоклеточная карцинома   squamous cell carcinoma	6 (35%)	26 (58%)	18 (64%)
Лимфогенные метастазы   Lymphogenic metastases			
• нет   no	9 (53%)	28 (62%)	12 (43%)
• есть   yes	8 (47%)	17 (38%)	16 (57%)
Гематогенные метастазы   Hematogenous metastases			
• нет   no	17 (100%)	35 (78%)	28 (100%)
• есть   yes	0 (0%)	10 (22%) p <sub>1</sub> =0,01 p <sub>3</sub> =0,003	0(0%)
Рецидивы   Relapses			
• нет   no	17 (100%)	44 (98%)	24 (86%)
• есть   yes	0 (0%)	1 (2%)	4 (14%)

БКГ – базальноклеточная гиперплазия, ПМ – плоскоклеточная метаплазия, p<sub>1</sub> – в сравнении с 1-й группой,

p<sub>3</sub> – в сравнении с 3-й группой

BСH – basal cell hyperplasia, SM – squamous metaplasia, p<sub>1</sub> – compared to group 1, p<sub>3</sub> – compared to group 3

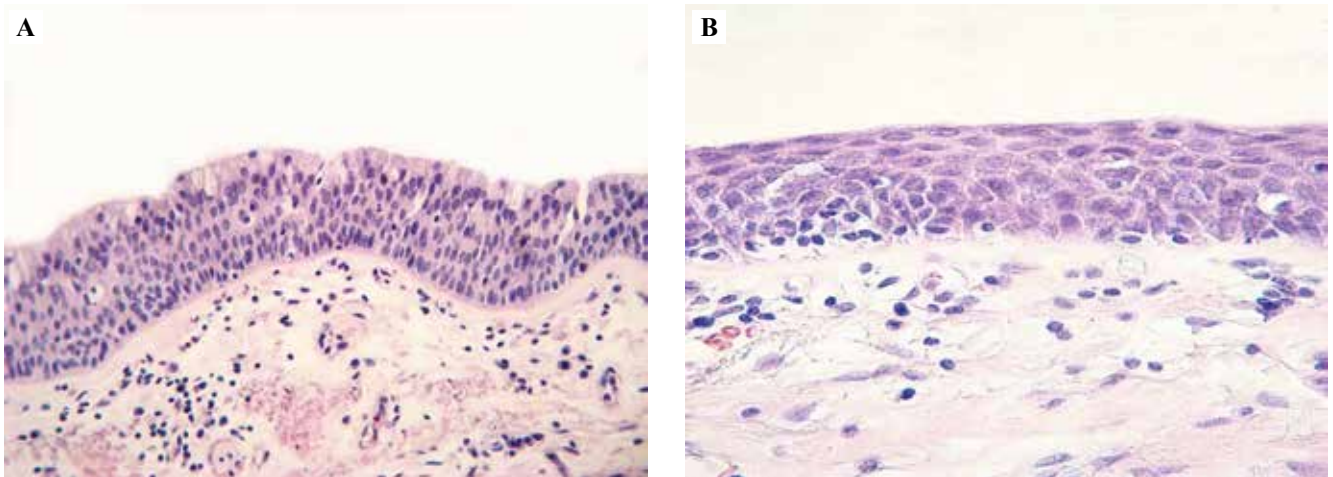


Рис. 2. Морфологические изменения бронхиального эпителия вне опухоли.

А – базальноклеточная гиперплазия, В – плоскоклеточная метаплазия. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 2. Morphological changes in the bronchial epithelium outside the tumor.

A – basal cell hyperplasia, B – squamous metaplasia. H&E stain,  $\times 200$

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Применяли методы описательной статистики, непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, корреляционный анализ по Спирмену, критерий  $\chi^2$ . Обсуждались результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$ .

## Результаты

У пациентов с аденокарциномой легкого частота обнаружения STAS не различалась в исследуемых группах и составляла 27% в случаях без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, 42% в случаях с изолированной плоскоклеточной метаплазией и 30% в случаях с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии.

При наличии плоскоклеточной карциномы достоверные различия в частоте распространения опухоли по воздушным пространствам также не обнаружены: в группе без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии STAS диагностирован в 50% случаев, в группе с изолированной базальноклеточной гиперплазией в 31% и в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в 39%.

Изучение вариантов STAS показало, что в аденокарциномах легкого с изолированной базальноклеточной гиперплазией в бронхиальном эпителии чаще (100%) наблюдался массивный STAS в сравнении со новообразованиями с изолированным STAS (0%;  $p = 0,0007$ ). В группе пациентов без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии массивный STAS диагностирован в 33% наблюдений, в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии не было обнаружено

ни одного случая с массивным распространением опухоли по воздушным пространствам.

У пациентов с плоскоклеточной карциномой в случаях без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии массивный STAS отсутствовал, в группе с изолированной базальноклеточной гиперплазией обнаруживался в 50% случаев, в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии – в 29% наблюдений (рис. 3).

В группе пациентов с аденокарциномой при наличии в бронхиальном эпителии базальноклеточной гиперплазии без плоскоклеточной метаплазии в случаях с лимфогенными метастазами чаще обнаруживался феномен STAS (71%) в сравнении с группой без лимфогенных метастазов (25%;  $p = 0,03$ ).

У пациентов с плоскоклеточной карциномой при наличии в бронхиальном эпителии базальноклеточной гиперплазии без плоскоклеточной метаплазии в случаях с наличием лимфогенных метастазов также чаще обнаруживался STAS (50%) в сравнении с пациентами без лимфогенной диссеминации опухоли (19%;  $p = 0,05$ ). Тенденция к подобного рода различиям обнаруживалась в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, в которой при наличии лимфогенных метастазов STAS выявлялся в 50% наблюдений, а при их отсутствии в 19% ( $p = 0,07$ ) (рис. 4 А, С).

Достоверные различия в частоте лимфогенного метастазирования в зависимости от варианта STAS не обнаружены ни в одной из исследуемых групп ни при аденокарциноме, ни при плоскоклеточной карциноме (рис. 4 В, D).

У пациентов с аденокарциномой легких связи наличия и варианта STAS с гематогенным метастазированием не было ни в одной из исследуемых групп. У пациентов с плоскоклеточной карциномой легких

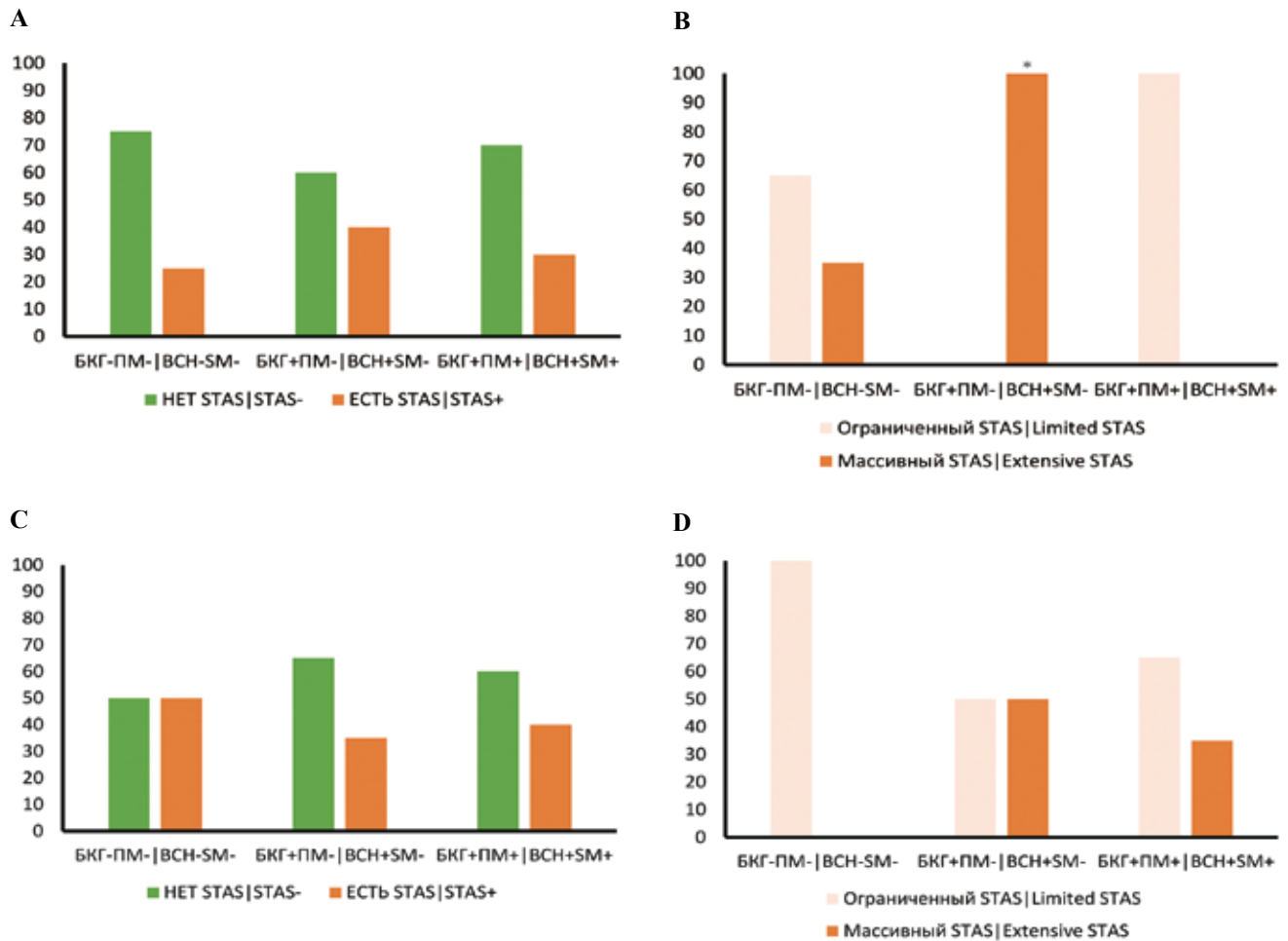


Рис. 3. Частота встречаемости наличия и вариантов STAS в группах пациентов с разными морфологическими изменениями бронхиального эпителия, %.

А – частота STAS при аденокарциноме, В – частота вариантов STAS при аденокарциноме, С – частота STAS при плоскоклеточной карциноме, D – частота вариантов STAS при плоскоклеточной карциноме

БКГ – базальноклеточная метаплазия, ПМ – плоскоклеточная метаплазия

\* – в группе пациентов с аденокарциномой легкого в подгруппе БКГ+ПМ+ массивный STAS наблюдался чаще (100%), чем изолированный STAS (0%;  $p=0,0007$ )

Fig. 3. The frequency and types of STAS in patient groups with different morphological changes in the bronchial epithelium, %.

A – STAS frequency in adenocarcinoma, B – the frequency of STAS types in adenocarcinoma, C – STAS frequency in squamous cell carcinoma, D – the frequency of STAS types in squamous cell carcinoma

ВСН – basal cell hyperplasia; SM – squamous metaplasia

\* – in the group of patients with lung adenocarcinoma in the ВСН+СМ+ subgroup, extensive STAS was observed more often (100%) than limited STAS (0%;  $p=0.0007$ )

обнаруживалась тенденция к большей частоте встречаемости случаев с наличием STAS в группе с изолированной БКГ с гематогенными метастазами (50%) в сравнении со случаями, когда отдаленной диссеминации не было (22%;  $p=0,08$ ). Различий в частоте встречаемости вариантов STAS в зависимости от наличия гематогенного метастазирования не было (рис. 5).

### Обсуждение

Проведенное исследование позволило выявить ряд закономерностей, которые могут дополнить представ-

ления о патогенезе такой формы опухолевой прогрессии, актуальной для рака легкого, как распространение опухоли по воздушным пространствам.

В отличие от убеждения, которого придерживаются некоторые авторы, о том, что связь регионарного метастазирования с наличием распространения опухоли по воздушным пространствам обнаруживается только в случаях с секторальной резекцией и отсутствует при лобэктомии [7], в нашем исследовании обнаружена связь данного феномена с локорегионарными метастазами в случаях с лобэктомией и не только с I стадией опухолевого процесса.

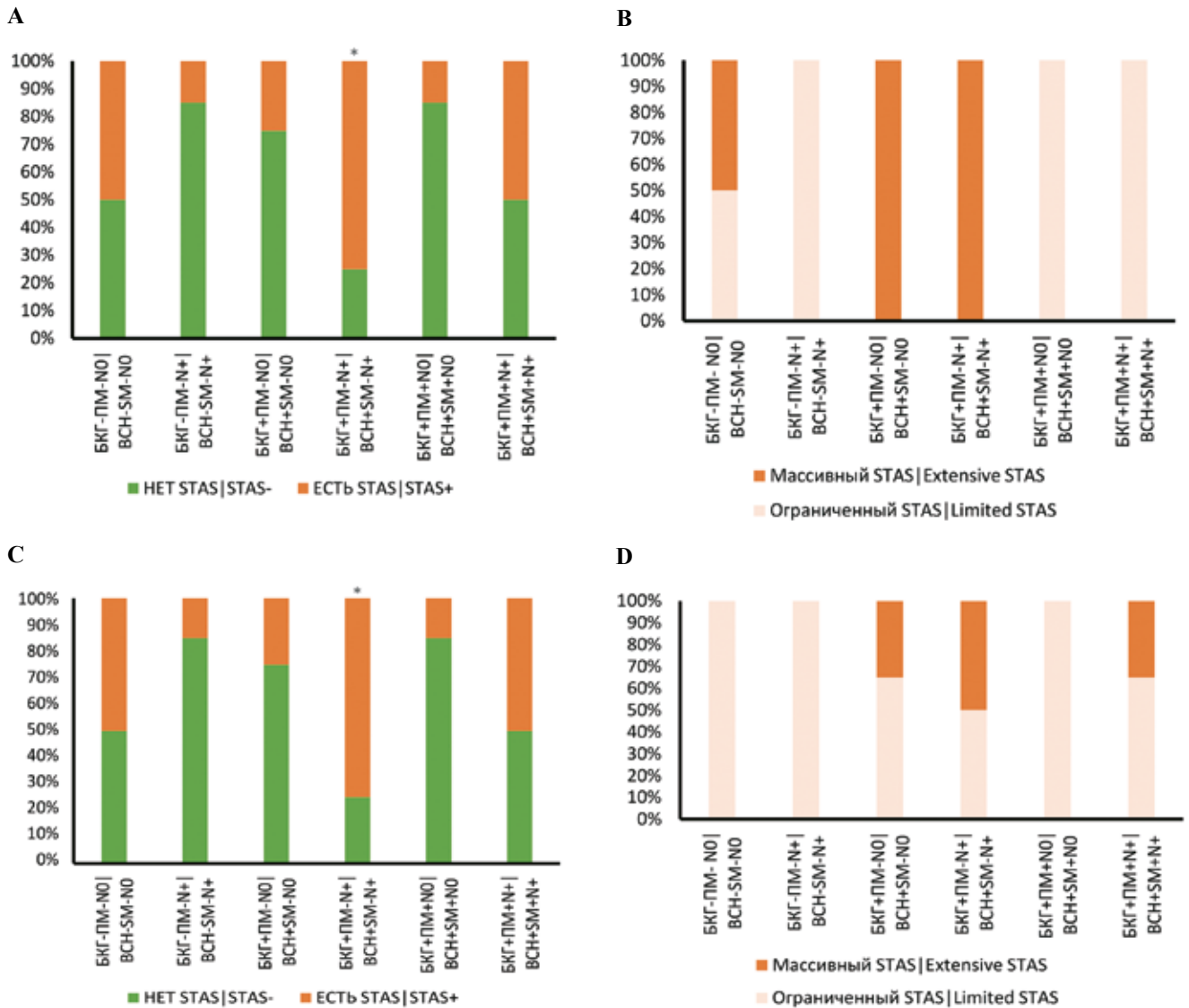


Рис. 4. Частота выявления наличия и вариантов STAS в группах пациентов с разными морфологическими изменениями бронхиального эпителия с отсутствием или наличием лимфогенных метастазов, %.

А – частота STAS с отсутствием или наличием лимфогенных метастазов при аденокарциноме, В – варианты STAS с отсутствием или наличием лимфогенных метастазов при аденокарциноме, С – частота STAS с отсутствием или наличием лимфогенных метастазов при плоскоклеточной карциноме, D – варианты STAS с отсутствием или наличием лимфогенных метастазов при плоскоклеточной карциноме

БКГ – базальноклеточная метаплазия; ПМ – плоскоклеточная метаплазия; N – метастазы в лимфатических узлах

\* (А) – феномен STAS определялся чаще у пациентов с аденокарциномой легкого в группе БКГ+ПМ-Н+ (71%)

по отношению к группе БКГ+ПМ-Н0 (25%;  $p=0,03$ )

\* (С) – феномен STAS определялся чаще у пациентов с плоскоклеточной карциномой легкого в группе БКГ+ПМ-Н+ (50%) по отношению к группе БКГ+ПМ-Н0 (19%;  $p=0,05$ )

Fig. 4. The frequency and types of STAS in patient groups with different morphological changes in the bronchial epithelium with or without lymphogenic metastases, %.

A – STAS frequency with or without lymphogenic metastases in adenocarcinoma, B – STAS types with or without lymphogenic metastases in adenocarcinoma, C – STAS frequency with or without lymphogenic metastases in squamous cell carcinoma, D – STAS types with or without lymphogenic metastases in squamous cell carcinoma

BCH – basal cell hyperplasia, SM – squamous metaplasia; N – nodular (lymphogenic) metastases

\* (A) – STAS phenomenon was determined more often in patients with lung adenocarcinoma in the BCH+SM-N+ group (71%) compared to that in the BCH+SM-N0 group (25%;  $p=0.03$ )

\* (C) – STAS phenomenon was determined more often in patients with squamous cell lung carcinoma in the BCH+SM-N+ group (50%) compared to that in the BCH+SM-N0 group (19%;  $p=0.05$ )

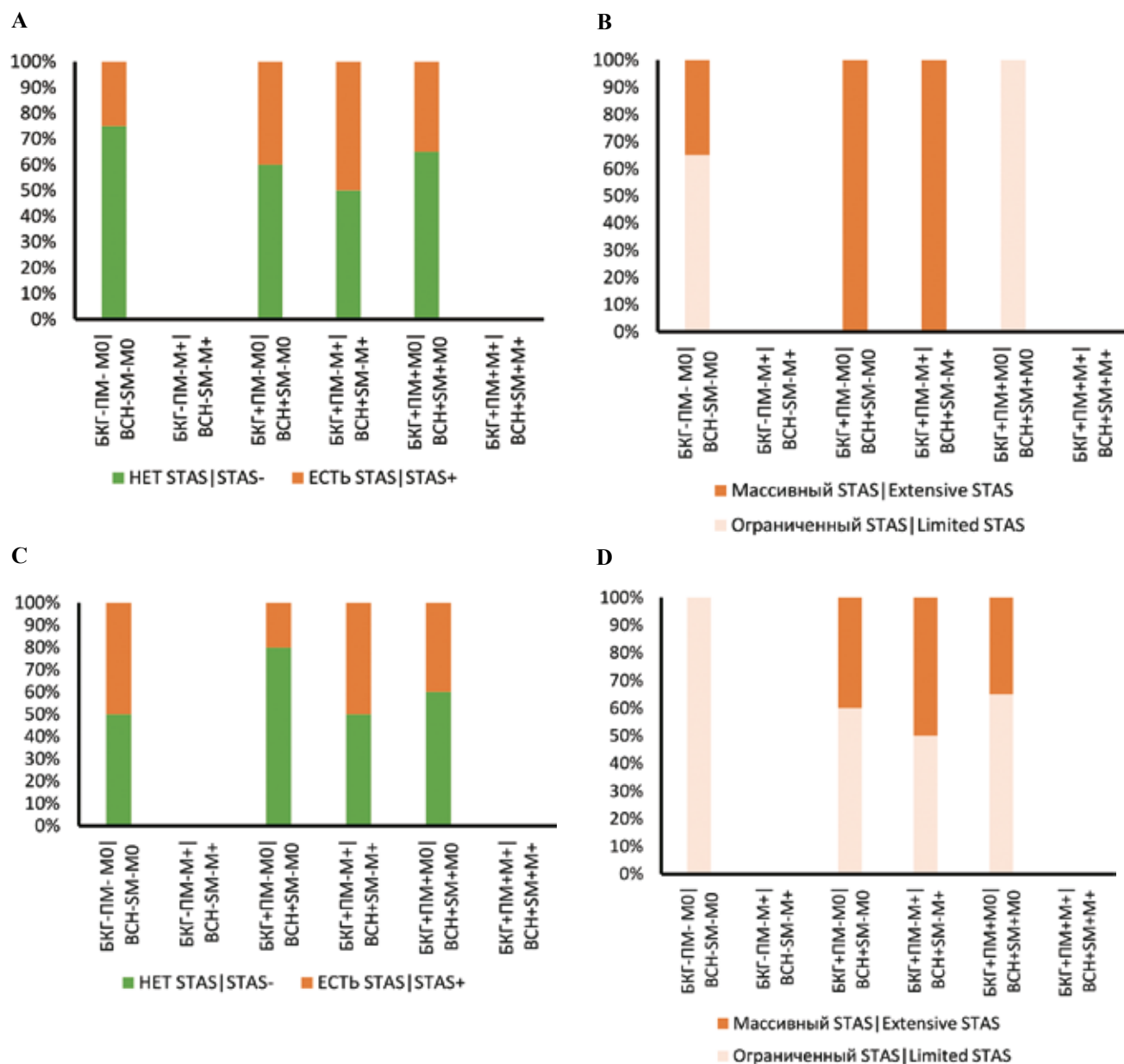


Рис. 5. Частота выявления наличия и вариантов STAS в группах пациентов с разными морфологическими изменениями бронхиального эпителия с отсутствием или наличием гематогенных метастазов, %.

А – частота STAS с отсутствием или наличием гематогенных метастазов при аденокарциноме, В – частота вариантов STAS с отсутствием или наличием гематогенных метастазов при аденокарциноме, С – частота STAS с отсутствием или наличием гематогенных метастазов при плоскоклеточной карциноме, D – частота вариантов STAS с отсутствием или наличием гематогенных метастазов при плоскоклеточной карциноме  
 БКГ – базальноклеточная метаплазия; ПМ – плоскоклеточная метаплазия; М – гематогенные метастазы

Fig. 5. The frequency and types of STAS in patient groups with different morphological changes in the bronchial epithelium with or without hematogenous metastases, %.

А – STAS frequency with or without hematogenous metastases in adenocarcinoma, B – STAS types with or without hematogenous metastases in adenocarcinoma, C – STAS frequency with or without hematogenous metastases in squamous cell carcinoma, D – STAS types with or without hematogenous metastases in squamous cell carcinoma  
 BCH – basal cell hyperplasia; SM – squamous metaplasia; M – hematogenous metastases

Оказалось, что сама по себе частота обнаружения STAS не зависит от гистологического типа опухоли и встречается с приблизительно одинаковой частотой у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточной

карциномой в группах с разным состоянием бронхиального эпителия. Вместе с тем результаты работы свидетельствуют о сопряженности STAS с массивной выраженностью с принадлежностью пациентов с НМРЛ



к группам высокого риска прогрессии. Во-первых, массивный STAS наблюдался в группе с изолированной БКГ, для которой характерен высокий риск гематогенного метастазирования. Во-вторых, массивный STAS достоверно чаще регистрировался при наличии лимфогенных метастазов в группах с изолированной БКГ и на уровне выраженной тенденции в группах с сочетанием БКГ с ПМ, для которой ранее был показан высокий риск рецидивирования [16]. Эти закономерности в разной степени наблюдаются как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточной карциноме. Наконец, при плоскоклеточной карциноме STAS на уровне выраженной тенденции наблюдается чаще в группе с наличием гематогенных метастазов.

Природу этой сопряженности двух категорий риска неблагоприятного течения и исхода НМРЛ, STAS и определенных изменений эпителия в смежных с опухолью бронхах можно объяснить следующей гипотезой. Первое, развитие STAS является проявлением высокой степени инвазивности опухолевых элементов НМРЛ. Второе, по-видимому, это мезенхимный механизм инвазии, поскольку, по данным литературы, STAS сопряжен с ЭМП [10], который лежит в основе данного вида инвазии. Третье, индукторами ЭМП являются цитокины клеток воспалительного инфильтрата, например TGF $\beta$ . Четвертое, как было предположено авторами, изучавшими прогностическое значение разных типов морфологических изменений бронхиального эпителия, в основе феномена лежат различия типа иммуновоспалительных реакций. Можно ожидать, что тип иммуновоспалительной реакции при изолированной БКГ близок к иммуновоспалительным реакциям в микроокружении первичных опухолей при НМРЛ, которые сопровождаются развитием ЭМП и STAS.

## Заключение

Таким образом, обнаружение STAS предлагается рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, связанный с риском локорегионарного метастазирования у пациентов, перенесших лобэктомию, при наличии изолированной базальноклеточной гиперплазии в слизистой оболочке бронхов, располагающихся на 3–4 см от границы основного опухолевого узла. Не исключено, что молекулярные события, происходящие в слизистой оболочке бронхов, являющиеся триггером эпителиально-мезенхимального перехода, играют ключевую роль и в развитии STAS.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.В. Завьялова, В.М. Перельмутер.  
Сбор и обработка материала – Д.М. Лоос, Д.С. Письменный, А.А. Дурова, Е.С. Андрухова, Е.О. Родионов, С.В. Миллер, Л.А. Таширева, О.В. Панкова.  
Написание текста – Д.М. Лоос.  
Редактирование – М.В. Завьялова, В.М. Перельмутер, С.А. Тузиков.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter.  
Collected the data and performed the analysis – D.M. Loos, D.S. Pismenny, A.A. Durova, E.S. Andryukhova, E.O. Rodionov, S.V. Miller, L.A. Tashireva, O.V. Pankova.  
Wrote the paper – D.M. Loos.  
Edited the manuscript – M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter, S.A. Tuzikov.

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

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

## Литература/References

1. Kadota K, Nitadori JI, Sima CS, Ujiie H, Rizk NP, Jones DR et al. Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the frequency and location of recurrences after limited resection for small stage I lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):806–14. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000486.
2. Kadota K, Kushida Y, Katsuki N, Ishikawa R, Ibuki E, Motoyama M et al. Tumor spread through air spaces is an independent predictor of recurrence-free survival in patients with resected lung squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(8):1077–86. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000872.
3. Lu S, Tan KS, Kadota K, Eguchi T, Bains S, Rekhtman N et al. Spread through Air Spaces (STAS) is an independent predictor of recurrence and lung cancer-specific death in squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2017;12(2):223–34. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.09.129.
4. Yanagawa N, Shiono S, Endo M, Ogata SY. Tumor spread through air spaces is a useful predictor of recurrence and prognosis in stage I lung squamous cell carcinoma, but not in stage II and III. *Lung Cancer.* 2018;120:14–21. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.03.018.
5. Han YB, Kim H, Mino-Kenudson M, Cho S, Kwon HJ, Lee KR et al. Tumor spread through air spaces (STAS): Prognostic significance of grading in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2021;34(3):549–61. DOI: 10.1038/s41379-020-00709-2.
6. Warth A. Spread through air spaces (STAS): A comprehensive update. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(5):501–7. DOI: 10.21037/tlcr.2017.06.08.
7. Mino-Kenudson M. Significance of tumor spread through air spaces (STAS) in lung cancer from the pathologist perspective. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(3):847–59. DOI: 10.21037/tlcr.2020.01.06.
8. Song T, Jiang L, Zhuo Z, Luo J, Alai G, Shen X et al. Impacts of thoracoscopic surgery and high grade histologic subtypes on spread through air spaces in small stage I lung adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019; 145(9):2375–82. DOI: 10.1007/s00432-019-02972-6.
9. Jia M, Yu S, Yu J, Li Y, Gao H, Sun PL. Comprehensive analysis of spread through air spaces in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma using the 8th edition AJCC/UICC staging system. *BMC Cancer.* 2020;20(1):705. DOI: 10.1186/s12885-020-07200-w.

10. Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Tolia M, Giaginis C, Galanopoulos M, Kiakou M et al. Epithelial-mesenchymal transition in non small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(4):1773–8. DOI: 10.21873/anticancer.11510.
11. Yagi Y, Aly RG, Tabata K, Barlas A, Rekhtman N, Eguchi T et al. Three-Dimensional histologic, immunohistochemical, and multiplex immunofluorescence analyses of dynamic vessel co-option of spread through air spaces in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):589–600. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.112.
12. Kerr KM, Popper HH. The differential diagnosis of pulmonary pre-invasive lesions. In: W Timens, HH Popper (eds.). *Pathology of the Lung.* European Respiratory Society Monograph. 2007. V. 39. P. 37–62. DOI: 10.1183/1025448x.ERM3907.
13. Dacic S. Pulmonary preneoplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(7):1073–8. DOI: 10.5858/2008-132-1073-PP.
14. Lantuéjoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia-sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology.* 2009;54(1):43–54. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03182x.
15. Pankova OV, Tashireva LA, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Pismenny DS et al. Premalignant changes in the bronchial epithelium are prognostic factors of distant metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Front Oncol.* 2021;11:771802. DOI: 10.3389/fonc.2021.771802.
16. Pankova OV, Denisov EV, Ponomaryova AA, Gerashchenko TS, Tuzikov SA, Perelmuter VM. Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3599–607. DOI: 10.1007/s13277-015-4196-2.
17. MB Amin, SB Edge, FL Greene, DR Byrd, RK Brookland, MK Washington et al (eds.). *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. Springer International Publishing, Cham: American College of Surgeons, 2017. 1049 p.
18. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243–60. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.
19. Warth A, Muley T, Kossakowski CA, Goepfert B, Schirmacher P, Dienemann H et al. Prognostic impact of intra-alveolar tumor spread in pulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(6):793–801. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000409.

### Информация об авторах

Марина Викторовна Завьялова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета, ведущий научный сотрудник НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Дмитрий Максимович Лоос – ординатор кафедры патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета.

Дмитрий Сергеевич Письменный – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета, врач клинической лабораторной диагностики отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Анастасия Алексеевна Дурова – ассистент кафедры патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета.

Елена Сергеевна Андрухова – ординатор кафедры патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета.

Евгений Олегович Родионов – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник торакального отделения НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Сергей Викторович Миллер – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник торакального отделения НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Сергей Александрович Тузиков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий торакальным отделением НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, профессор кафедры онкологии Сибирского государственного медицинского университета.

Любовь Александровна Таширева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Ольга Владимировна Панкова – доктор биологических наук, старший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Владимир Михайлович Перельмутер – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

### Author information

Marina V. Zavyalova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University; Leading Researcher, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

Dmitry M. Loos – Resident of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-4098-6076>

Dmitry S. Pismenny – Cand. Sci. (Med.), Assistant of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University; Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of General and Molecular Pathology, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0001-8973-8439>

Anastasia A. Durova – Assistant of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-3225-2440>

Elena S. Andryukhova – Resident of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-0909-9206>

Evgeniy O. Rodionov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Thoracic Department, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.

<https://orcid.org/0000-0003-4980-8986>

Sergey V. Miller – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Thoracic Department, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-5365-9840>

Sergei A. Tuzikov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Thoracic Department, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute; Professor of the Department of Oncology, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-0884-1838>

Lyubov A. Tashireva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center.

<https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

Olga V. Pankova – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-5510-1808>

Vladimir M. Perelmuter – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Tomsk National Research Medical Center, Cancer Research Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>

## Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global

И.М. Тележникова<sup>1,2</sup>, Л.Г. Жукова<sup>1</sup>, В.В. Кометова<sup>3</sup>, С.Г. Хомерики<sup>1</sup>,  
Н.С. Карнаухов<sup>1</sup>, Е.И. Хатькова<sup>1</sup>, Г.Р. Сетдикова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Неоадъювантная терапия (НАТ) предоставляет возможность *in vivo* оценить чувствительность первичной опухоли к системной терапии. Тем не менее результаты клинического значения Ki67 в качестве прогностического фактора эффективности химиотерапии при раке молочной железы (РМЖ) до сих пор противоречивы. На совещании Международной рабочей группы по интерпретации Ki67 при РМЖ (IKWG), состоявшемся в октябре 2019 года, рекомендации включили в себя разработку стандартизированной методики визуальной оценки global, которая предлагается к внедрению. Цель исследования – оценить клиническую значимость Ki67 у пациенток при РМЖ с применением методики визуальной интерпретации global.

*Материалы и методы.* Материалом исследования послужили готовые гистологические блоки биопсийного и послеоперационного материала от 32 пациенток с РМЖ, получивших неоадъювантную химиотерапию. Проведен анализ динамики экспрессии Ki67 у пациенток с остаточной опухолью. Оценены корреляции клинико-морфологических признаков и Ki67. Индекс Ki67 определялся как общее среднее значение по методике global. Для повышения точности оценки в качестве вспомогательного инструмента применялось приложение для смартфонов Ki67 scoring app.

*Результаты.* При исследовании индекса Ki67 до проведения НАТ медианное значение составило 75,0% (34,8–85,0), после нее – 1,0% (0,0–6,2) ( $p < 0,0001$ ). В группе с наличием остаточной опухоли значение Ki67 было статистически значимо ( $p = 0,0077$ ) ниже [36% (30–75)] по сравнению с группой без остаточной опухоли [85% (78,8–90)].

*Заключение.* Результаты исследования свидетельствуют о том, что значение Ki67 до НАТ является сильным прогностическим фактором ее эффективности. Положительные исследования с использованием маркера Ki67 для сопутствующей диагностики могут рассматриваться в качестве правильного диагностического вектора только при соблюдении строгой аналитической валидности.

**Ключевые слова:** Ki67, рак молочной железы, неоадъювантная терапия, методика global, IKWG, Ki67 scoring app

**Для корреспонденции:** Инесса Михайловна Тележникова. E-mail: inessatelezchnikova@gmail.com

**Для цитирования:** Тележникова И.М., Жукова Л.Г., Кометова В.В., Хомерики С.Г., Карнаухов Н.С., Хатькова Е.И., Сетдикова Г.Р. Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.

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

Статья поступила 22.08.2022. Получена после рецензирования 05.09.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer using the global scoring

И.М. Тележникова<sup>1,2</sup>, Л.Г. Жукова<sup>1</sup>, В.В. Кометова<sup>3</sup>, С.Г. Хомерики<sup>1</sup>,  
Н.С. Карнаухов<sup>1</sup>, Е.И. Хатькова<sup>1</sup>, Г.Р. Сетдикова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>2</sup> M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

<sup>3</sup> V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Neoadjuvant therapy (NAT) provides an *in vivo* assessment of primary tumor sensitivity to systemic therapy. However, the data on Ki67 clinical significance as a prognostic factor for the

effectiveness of chemotherapy in breast cancer (BC) cause controversy. The International Ki67 Interpretation Workgroup for Breast Cancer (IKWG) meeting held in October 2019, recommended developing a standardized methodology for visual global scoring, which is proposed to be used in clinical practice. The aim of the study was to assess the clinical significance of Ki67 using visual global scoring in BC.

*Materials and methods.* The study included 32 patients with proven BC that received preoperative neoadjuvant therapy. We studied paraffin histological blocks, analyzed the Ki67 expression over time in patients with residual tumors, and assessed the correlations of clinical and morphological signs before treatment. Ki67 was determined as the overall average with global scoring. The Ki67 scoring app for smartphones was used as an auxiliary tool to increase the accuracy.

*Results.* The median value of the Ki67 index before NAT was 75.0% (34.8–85.0) and after the therapy it was 1.0% (0.0–6.2) [ $p < 0.0001$ ]. The Ki67 value was significantly lower ( $p = 0.0077$ ) [36% (30–75)] in the presence of residual tumor compared to that in patients without it [85% (78.8–90)].

*Conclusion.* The Ki67 index before NAT is a strongly prognostic factor of its effectiveness. The research of the Ki67 marker for concomitant diagnosis, which showed prognostic Ki67 role, can be considered as a correct diagnostic vector, only if strict analytical validity is observed.

**Keywords:** Ki67, breast cancer, neoadjuvant therapy, global scoring, IKWG, Ki67 scoring app

**Corresponding author:** Inessa M. Telezhnikova. E-mail: inessatelezhnikova@gmail.com

**For citation:** Telezhnikova I.M., Zhukova L.G., Kometova V.V., Khomeriki S.G., Karnaukhov N.S., Khatkova E.I., Setdikova G.R. Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer using the global scoring. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):36–43 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.

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

**Received 22.08.2022. Received in revised from 05.09.2022. Accepted 12.12.2022.**

## Введение

В настоящее время выбор лекарственной терапии рака молочной железы (РМЖ) основывается на его молекулярно-биологическом подтипе [1]. Одним из ключевых маркеров суррогатного определения молекулярного подтипа служит ядерный антиген Ki67 [2, 3]. Данный белок является самым широко применяемым в качестве маркера пролиферации. Неoadъювантная терапия (НАТ) перед оперативным лечением предоставляет уникальную возможность оценки чувствительности *in vivo* первичной опухоли к системной терапии [4]. Показано, что высокий уровень экспрессии Ki67 связан с увеличением рецидивов и худшей выживаемостью при РМЖ [5]. Были получены противоречивые результаты клинического значения Ki67 в качестве прогностического фактора эффективности химиотерапии [6–8]. В ряде исследований высокий уровень Ki67 коррелировал с хорошим ответом на НАТ. Тем не менее при многофакторном анализе не все исследования показали, что Ki67 выступает независимым предиктором полного морфологического ответа (pCR) [8–10]. Коллегами из Японии опубликована наглядная работа, посвященная роли фиксации [11]. Длительная фиксация вызывала постепенное снижение уровня экспрессии Ki67, в то время как недостаточная фиксация вызывала его значительное снижение. Чтобы предотвратить недостаточную фиксацию, образец следует доставлять в лабораторию патоморфологии строго в нативном виде.

Из-за отсутствия общепринятой стандартной методики подсчета уровня Ki67 комитет Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO) определил, что доказательств, подтверждающих клиническую значимость примене-

ния этого биомаркера, недостаточно для того, чтобы рекомендовать рутинное использование Ki67 в прогностических целях [12]. Аналогичные данные отражены в действующем протоколе по тестированию биомаркеров при РМЖ (Version: 1.4.1.1, 2021) Коллегии американских патологов (College of American Pathologists, CAP), являющейся мировым лидером стандартизации ИГХ исследований [13, 14]. Необходимо отметить, что в современной гистологической классификации опухоли молочной железы Всемирной организации здравоохранения (2019) суррогатное молекулярное тестирование (IHC4-тест), включающее Ki67, не получило нормативного признания, в отличие от генетических тестов, используемых в клинической практике для прогнозирования риска рецидива заболевания у пациентов с ER+/HER2- РМЖ [15, 16]. При этом на 17-й Международной конференции по РМЖ St. Gallen в 2021 году генетическое тестирование рекомендовано экспертами лишь в отдельных случаях [17, 18].

В 2011 году была создана Международная рабочая группа по интерпретации Ki67 при РМЖ (International Ki67 in Breast Cancer Working Group, IKWG). Глобальной целью данной группы является определение аналитической и клинической валидности маркера Ki67 для рутинного применения в практике [19]. В 2016 году IKWG инициировала исследование, направленное на валидацию методики визуальной оценки Ki67, в котором приняли участие 22 лаборатории. Каждая лаборатория оценивала Ki67 с использованием трех различных методик:

- 1) отношение среднего количества позитивно окрашенных клеток к общему количеству клеток (unweighted global);

- 2) отношение среднего количества позитивно окрашенных клеток, умноженного на индекс суммы по каждой категории, к общему количеству клеток (weighted global);
- 3) горячая точка (hot-spot).

Лучшую воспроизводимость показали методики подсчета общего среднего значения без статистически значимой разницы между ними. По ним оценивают средний балл или долю позитивных клеток на всей доступной площади инвазивной опухоли в препарате. Оценка Ki67 выполняется одинаково, но окончательный подсчет индекса рассчитывается по разным формулам [20, 21].

На совещании IKWG в октябре 2019 года были оценены текущие данные аналитической валидности и клинической значимости Ki67 при РМЖ. Основное внимание IKWG уделялось интерпретации уже обработанных и окрашенных образцов. Консенсусные решения и рекомендации включили в себя следующее: 1) признание решающего значения преаналитического этапа; 2) разработка и внедрение стандартизированной методики визуальной оценки global; 3) обеспечение контроля качества; 4) признание Ki67 прогностическим маркером при ER+/HER2- T1-2 N0-1 РМЖ; 5) необходимость развития методов автоматизированного подсчета, что может помочь преодолеть некоторые существующие ограничения. IKWG рекомендует, чтобы образцы РМЖ для тестирования Ki67 обрабатывались в соответствии с руководящими принципами ASCO и CAP для HER2 и гормональных рецепторов [21].

Аналитической валидности сложно достигнуть из-за проблем стандартизации. Факторы, способствующие разногласиям между лабораториями, следующие: различия в методике окрашивания, разные методики подсчета. Суть проблемы сводится к тому, что достоверно интерпретировать клиническую значимость Ki67 по результатам исследований, где отсутствуют данные о методе и методике оценки Ki67, не представляется возможным [22].

Цель данной работы заключается в том, чтобы оценить клиническую значимость уровня экспрессии Ki67 у пациенток при РМЖ при соблюдении строгой аналитической валидности с применением методики визуальной интерпретации global, рекомендованной IKWG в 2020 году.

### Материалы и методы

Проведено ретроспективное когортное исследование, выполненное на материале от 32 пациенток, проходивших лечение в Московском клиническом научном центре им. А.С. Логинова по поводу рака молочной железы за период с 2019 по 2020 год. Объектами исследования послужили готовые гистологические блоки

биопсийного и операционного материала после неоадьювантной химиотерапии. Критериями включения являлись соблюдение правильной фиксации образцов (образцы доставляли в лабораторию патоморфологии в течение часа после операции, строго в нативном виде, проводились макроскопическое исследование и вырезка нативного материала, размер фрагмента ткани в гистологических кассетах не превышал 18×15×4 мм, фрагменты фиксированы в 10% забуференном формалине в течение 24–48 часов); наличие парафиновых блоков, содержащих достаточный объем ткани для изготовления как минимум четырех репрезентативных срезов; клинические данные должны были содержать направительный диагноз и предоперационный эпикриз, сведения о проведенной неоадьювантной терапии. Критерии невключения: недостаточный объем ткани в опухолевых блоках для проведения исследования, отсутствие необходимых клинических данных. Критерии исключения: выявление выраженных дефектов фиксации, обезвоживания и обезжиривания образцов отобранных готовых парафиновых блоков при изготовлении гистологических и иммуногистохимических микропрепаратов. Добровольное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013) подписано всеми участницами исследования. Исследование одобрено этическим комитетом МКНЦ (протокол от 26.01.2022). Проведен анализ динамики уровня экспрессии Ki67 у пациенток с остаточной опухолью. Оценены корреляции клинико-морфологических признаков и Ki67. Для гистологического исследования готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для иммуногистохимического исследования были использованы антитела ANTI-KI-67 (30-9) (Ventana, США). В готовом разведении флакон-дозатор емкостью 5 мл с антителом confirm anti-ki-67 содержит около 10 мкг (2 мкг/мл) моноклонального иммуноглобулина, время инкубации составило 16 минут, температура 37°C при использовании автоматического устройства для окрашивания гистологических препаратов BenchMark Series (Roche Diagnostics, Швейцария). Реакции проводили на иммуногистостейнере закрытого типа Ventana BenchMark Ultra (Roche Diagnostics, Швейцария) по протоколу, рекомендованному производителем. Препараты были отсканированы с помощью Panoramic 250 FLASH II system (3DHISTECH, Венгрия) с целью повышения точности измерения. Уровень экспрессии маркера пролиферации Ki67 определялся как общее среднее значение по методике unweighted global, рекомендованной Международной рабочей группой по интерпретации Ki67 при РМЖ (IKWG, 2020). В исследовании применялась следующая формула:

$$\text{Невзвешенный показатель Ki67} = \frac{\text{Общее количество позитивно окрашенных опухолевых клеток в выбранных полях}}{\text{Общее количество всех опухолевых клеток в выбранных полях}} \times 100$$

### Описание методики визуального подсчета unweighted global

1. Оценить процентную долю ткани без инвазивной опухоли (нормальная ткань и карцинома *in situ*).

2. В инвазивном компоненте опухоли оценить процентную долю по каждой из четырех категорий уровня пролиферативной активности по Ki67 (высокий, средний, низкий, негативный) (рис. 1).

3. Этап присвоения количества репрезентативных полей. Выбрать четыре поля по алгоритму превалирования категории.

4. Посчитать долю позитивных клеток по методике «пишущая машинка» в четырех полях на 100 клеток (рис. 2) [20].

5. Поделить общее количество позитивных клеток на общее количество посчитанных клеток, применив формулу.

Для повышения точности оценки по методике global в качестве вспомогательного инструмента применялось приложение для смартфонов Ki67 scoring app (рис. 3). Оценку проводили два специалиста, один из которых прошел сертифицированный международный практический курс по интерпретации биомаркеров при РМЖ Breast Cancer Biomarker Workshop, Roche 2021, в заключение выносили консенсусное мнение. Значения Ki67 были выражены как процент положительных клеток в каждом наблюдении. Значение Ki67 в случаях с pCR было оценено как 0%.

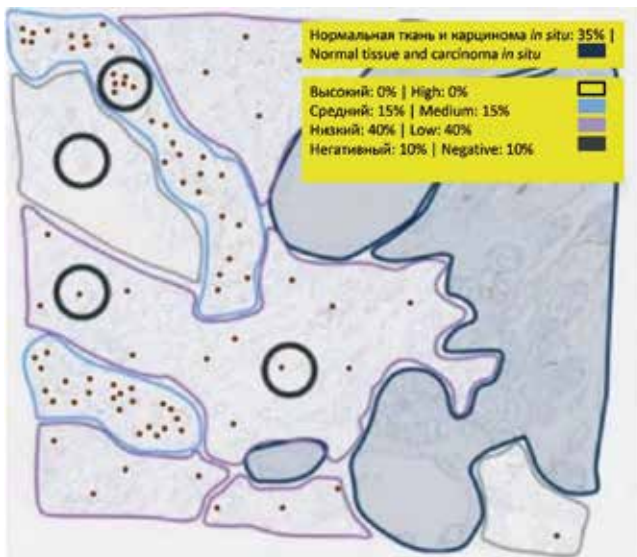


Рис. 1. Пример цифровой разметки в опухоли по методике визуального подсчета unweighted global. Нормальная ткань и карцинома *in situ* – 35%. Процентная доля инвазивного рака по каждой из четырех категорий уровня пролиферативной активности по Ki67: высокий – 0%, средний – 15%, низкий – 40%, негативный – 10%

Fig. 1. Digital mapping in a tumor using the unweighted global visual scoring. Normal tissue and carcinoma *in situ* – 35%. The percentage of invasive cancer in each of the 4 categories of Ki67 proliferative activity level: high – 0%, medium – 15%, low – 40%, negative – 10%

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводились с использованием среды для статистических вычислений R 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия). Описательные статистики для количественных переменных представлены в виде среднего (SD) и медианы (Q1; Q3), для качественных – в виде абсолютных и относительных частот. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для изучения связи категориальных переменных использовался точный тест Фишера, ассоциацию считали статистически значимой при  $p < 0,05$ . Для оценки взаимосвязи между количественными переменными

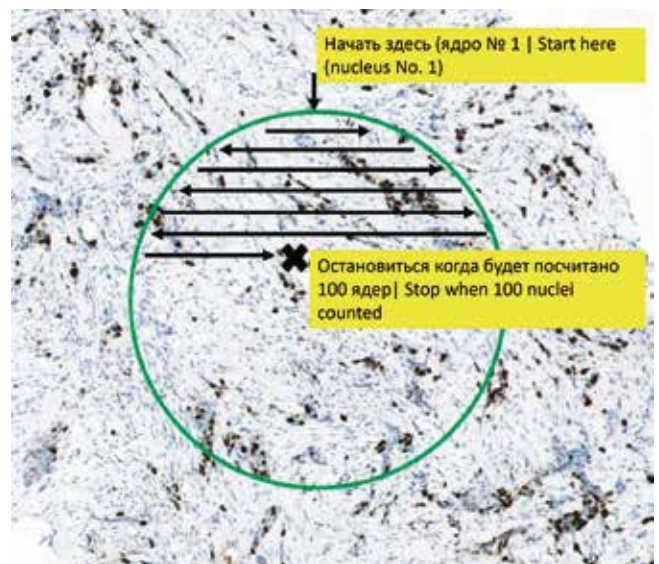


Рис. 2. Шаблон «пишущей машинки»,  $\times 400$

Fig. 2. “Typewriter” template,  $\times 400$

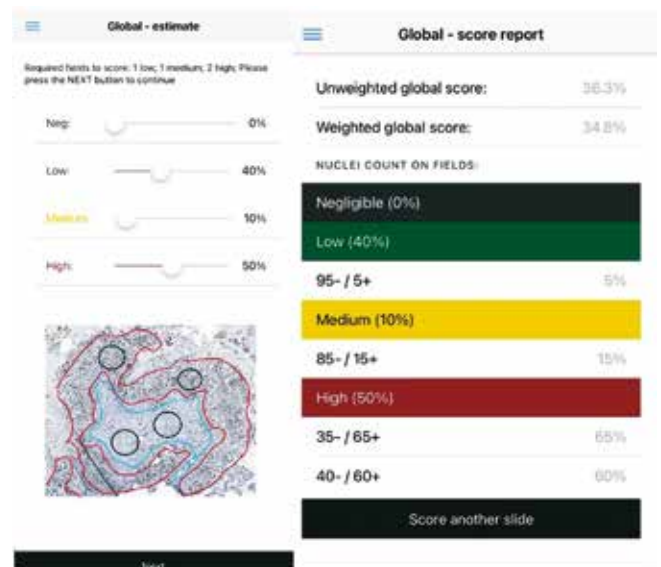


Рис. 3. Оценка уровня экспрессии Ki67 по методике unweighted global посредством вспомогательного инструмента Ki67 scoring app

Fig. 3. Assessment of the Ki67 expression level using the unweighted global method using the auxiliary Ki67 scoring app

использовался коэффициент ранговой корреляции ( $\rho$ ) Спирмена с соответствующим 95% доверительным интервалом, между ранговыми переменными – коэффициент корреляции  $\tau_B$  Кендалла с соответствующим 95% доверительным интервалом.

**Результаты**

В исследование вошли 32 пациентки с РМЖ. Средний их возраст составил  $52,5 \pm 9,4$  года, медианный возраст – 52,0 года (46,5; 58,2), распределение участниц исследования по возрасту представлено на рисунке 4. На рисунке 5 отображено распределение участниц исследования в отношении репродуктивного статуса. У большинства пациенток был диагностирован инвазивный протоковый рак – 29/32 случая (90,6%), кроме единичных случаев инвазивного долькового рака, инвазивного рака комбинированного строения и микропапиллярного рака. По ноттингемской системе (NGS) до проведения НАТ опухоль была отнесена к III степени у 10 пациенток (31,2%), II степени – у 20 (62,5%) и I степени – у двух (6,2%). В результате ИГХ исследования в большинстве случаев был диагностирован люминальный В HER2 негативный суррогатный молекулярный подтип рака (13 случаев, 40,6%), реже встречались тройной негативный (семь случаев, 21,9%), нелюминальный HER2-позитивный (шесть случаев, 18,8%) и люминаль-

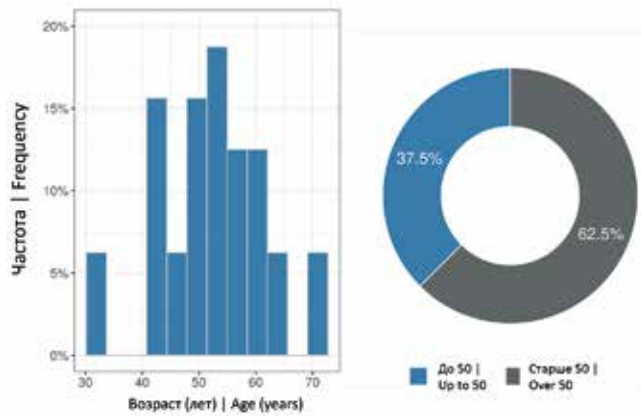


Рис. 4. Распределение пациенток по возрасту  
Fig. 4. Patients' distribution by age



Рис. 5. Репродуктивный статус участниц исследования  
Fig. 5. Patients' reproductive status

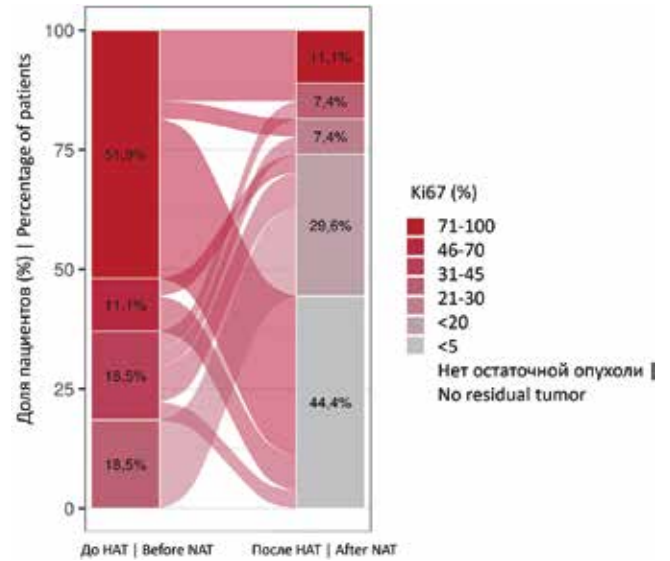


Рис. 6. Динамика уровня экспрессии Ki67  
Fig. 6. The Ki67 expression level over time

ный В HER2-позитивный (шесть случаев, 18,8%) подтипы. Класс RCB (Residual Cancer Burden) определен как 0 у 12 пациенток (37,5%), I – в четырех случаях (12,5%), II – в 15 случаях (46,9%), III – в одном случае.

При исследовании уровня экспрессии Ki67 (рис. 6) до проведения НАТ медианное значение составило 75,0% (34,8; 85,0), после нее – 1,0% (0,0; 6,2) ( $p < 0,0001$ ). В таблице представлены результаты характеристик пациенток в зависимости от наличия остаточной опухоли после НАТ. Выявлено статистически значимо большее значение Ki67 до проведения НАТ у пациенток без остаточной опухоли (рис. 7). В случае наличия остаточной опухоли значение Ki67 до НАТ было статистически значимо ( $p = 0,0077$ ) ниже (36%, 30–75) по сравнению с наблюдениями без остаточной опухоли (85%, 78,8–90).

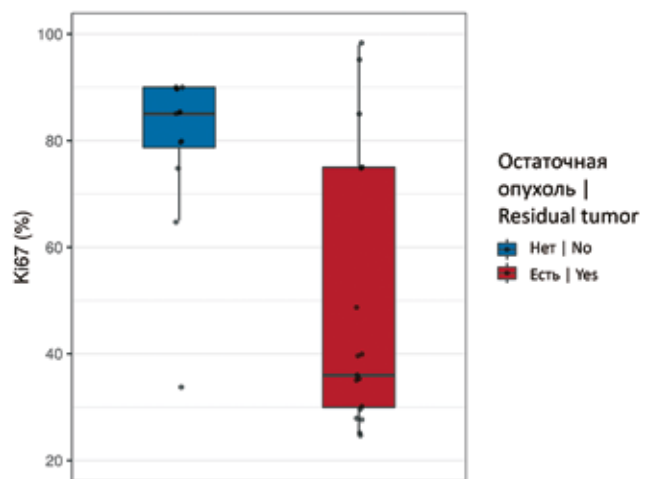


Рис. 7. Уровень Ki67 у пациенток с остаточной опухолью и без нее  
Fig. 7. Ki67 levels in patients with and without residual tumor



Результаты сравнительного анализа характеристик пациенток в зависимости от наличия остаточной опухоли после НАТ | Results of a comparative analysis of patient characteristics depending on the presence of residual tumor after NAT

Характеристика   Characteristics		Остаточная опухоль   Residual tumor		p
		нет   no	есть   yes	
Возраст   Age		50,6 (7,7) 51,5 (48,5; 53,5)	53,4 (11,1) 53,0 (44,0; 59,0)	0,3988
Репродуктивный статус   Reproductive status	репродуктивный возраст   reproductive age	4/12 (33,3%)	6/17 (35,3%)	0,6629
	пременопауза   premenopause	1/12 (8,3%)	–	
	менопауза до 5 лет   menopause up to 5 years	4/12 (33,3%)	4/17 (23,5%)	
	менопауза больше 5 лет   menopause more than 5 years	3/12 (25,0%)	7/17 (41,2%)	
Степень злокачественности по ноттингемской системе   Nottingham grading system	I	–	2/17 (11,8%)	0,7009
	II	8/12 (66,7%)	11/17 (64,7%)	
	III	4/12 (33,3%)	4/17 (23,5%)	
Ki67 (%)		79,1 (16,0) 85,0 (78,8; 90,0)	48,8 (25,8) 36,0 (30,0; 75,0)	0,0077
Ki67 диапазон (%)   Ki67 range (%)	21–30	–	5/17 (29,4%)	0,0215
	31–45	1/12 (8,3%)	6/17 (35,3%)	
	46–70	2/12 (16,7%)	1/17 (5,9%)	
	71–100	9/12 (75,0%)	5/17 (29,4%)	

## Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что значение уровня Ki67 до неoadьювантной химиотерапии является сильным прогностическим фактором ее эффективности независимо от суррогатного молекулярного подтипа опухоли. Пациентки с высоким уровнем пролиферации в опухоли могут быть кандидатами для неoadьювантной химиотерапии. В многочисленных исследованиях показатель пролиферации опухоли был связан с прогнозом и чувствительностью к химиотерапии. Все мультигенные прогностические тесты, используемые при РМЖ, включают набор генов, связанных с пролиферацией, такие как *MKI67*. Ki67 является количественной мерой пролиферации, и более высокие уровни экспрессии Ki67 также ассоциируются с лучшим ответом на НАТ и худшей выживаемостью. Следует отметить, что этот показатель не изучался как предиктор адьювантного режима химиотерапии в крупных клинических испытаниях. Также в клинических исследованиях прогностического и предиктивного значения Ki67 использовали разные критерии оценки. В отличие от ER или HER2 маркер Ki67 не является бимодальным, и не существует установленного порога для определения высокого или низкого порогового уровня Ki67, что затрудняет интерпретацию данных литературы. Межлабораторная вариабельность в оценке Ki67 и отсутствие стандартов оценки еще больше препятствуют установлению универсального порога Ki67, поэтому использование его в клинической практике в настоящее

время вызывает много споров и вопросов. В последнее десятилетие IKWG пыталась стандартизировать тестирование Ki67. В 2021 году IKWG и эксперты по первичной терапии раннего РМЖ в Санкт-Галлене сообщили, что уровни экспрессии Ki67 5% и 30% могут быть достоверно интерпретированы как низкий и высокий, клиническая значимость промежуточной зоны между этими пороговыми значениями остается неизвестной. Кроме того, большинство исследований Ki67 было проведено с использованием образцов преимущественно от женщин в постменопаузе 1–2-й стадии. Остается неясным, можно ли экстраполировать эти результаты на женщин в пременопаузе или пациенток с более высокой стадией РМЖ. Учитывая описанные выше проблемы с количественной оценкой уровня экспрессии Ki67, использование Ki67 для руководства при проведении НАТ остается исследовательским вопросом [23]. Необходимо также понимать, что правильная фиксация операционного образца критически важна для стандартной оценки Ki67. ASCO не рекомендует рутинное тестирование Ki67 вследствие трудностей, возникающих на аналитическом этапе иммуногистохимического исследования. Из-за проблем стандартизации достаточно сложно достичь аналитической валидности. Решить существующие проблемы преаналитического этапа важно, так как аналитическая достоверность интерпретации маркера Ki67 необходима для выбора правильного и оптимального лечения при РМЖ. Чувствительность к химиотерапии не зависит от распространенности процесса, возраста и риска

прогрессирования, а определяется биологическими характеристиками опухоли. В последние годы были достигнуты успехи в молекулярном понимании биологии РМЖ с разработкой нескольких прогностических мультигенных сигнатур, однако по результатам ряда исследований показано, что мультипараметрические тесты сами не до конца валидированы и несомненно несут значительное финансовое бремя для системы здравоохранения [24, 25]. Ki67 – доступный, недорогой и при этом ценный прогностический и предиктивный маркер. Аналитическая валидность Ki67 может быть достижима. Для этого необходима стандартизация патологоанатомических и иммуногистохимических исследований биопсийного и операционного материала, а также целесообразно внедрение единой методики оценки Ki67, визуальной интерпретации global, рекомендованной IKWG в 2020 году.

### Заключение

Положительные исследования с использованием маркера Ki67 для сопутствующей диагностики могут рассматриваться в качестве правильного диагностического вектора только в случае соблюдения строгой аналитической валидности. Достоверно интерпретировать клиническую значимость Ki67 по результатам исследований, где отсутствуют данные о методике оценки Ki67, не представляется возможным. Клиническим онкологам необходимо учитывать недостатки и ограничения таких исследований.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.М. Тележникова, Г.Р. Сетдикова.

Сбор и обработка материала – И.М. Тележникова, Г.Р. Сетдикова, В.В. Кометова, Н.С. Карнаухов, Е.И. Хатькова.

Написание текста – И.М. Тележникова.

Редактирование – Г.Р. Сетдикова, Л.Г. Жукова, С.Г. Хомерики.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment –

I.M. Telezhnikova, G.R. Setdikova.

Collected the data and performed the analysis – I.M. Telezhnikova, G.R. Setdikova, V.V. Kometova, N.S. Karnaukhov, E.I. Khatkova.

Wrote the paper – I.M. Telezhnikova.

Edited the manuscript – G.R. Setdikova, L.G. Zhukova, S.G. Khomeriki.

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

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

### Литература/References

1. Стенина М.Б., Жукова Л.Г., Королева И.А., Пароконная А.А., Семиглазова Т.Ю., Тюляндин С.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. 2020;10(3s2):150–187. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-09.  
Stenina MB, Zhukova LG, Koroleva IA, Parokonnaya AA, Semiglazova TYu, Tyulyandin SA et al. Guidelines for medical treatment of breast cancer. Malignant Tumors: RUSSCO Guidelines. 2020;10(3s2):150–187 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-09.
2. Tsang JYS, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020; 27(1):27–35. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000232.
3. Kreipe H, Harbeck N, Christgen M. Clinical validity and clinical utility of Ki67 in early breast cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2022;14:17588359221122725. DOI: 10.1177/17588359221122725.
4. Sheri A, Dowsett M. Developments in Ki67 and other biomarkers for treatment decision making in breast cancer. *Ann Oncol.* 2012;23(Suppl. 10):219–27. DOI: 10.1093/annonc/mds307.
5. Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, Khan SM, Edhi MM, Ali JP et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):605. DOI: 10.1186/s13104-019-4653-x.
6. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y et al. An evaluation of predictive factors involved in clinical or pathological response to primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer.* 2002;9(2):145–52. DOI: 10.1007/BF02967579.
7. Wajid S, Samad FA, Syed AS, Kazi F. Ki-67 and its relation with complete pathological response in patients with breast cancer. *Cureus.* 2021;13(7):e16788. DOI: 10.7759/cureus.16788.
8. Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, Harvey JD et al. Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol.* 2022;8(3):420–44. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.6987.
9. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: Prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174–83. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1.
10. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: Use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1168–76. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1024.
11. Arima N, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Fujisue M, Okumura Y et al. The importance of tissue handling of surgically removed breast cancer for an accurate assessment of the Ki-67 index. *J Clin Pathol.* 2016;69(3):255–9. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203174.
12. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287–312. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.2364.
13. Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, Berman MA, Hayes DF, Hicks DG et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(5):595–601. DOI: 10.5858/arpa.2013-0566-CP.
14. Fitzgibbons PL, Connolly JL. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Breast Biomarker Reporting.* Version 1.4.1.1. 2021. Available from: [https://documents.cap.org/protocols/Breast\\_Bmk\\_1.4.1.1.REL\\_CAPCP.pdf](https://documents.cap.org/protocols/Breast_Bmk_1.4.1.1.REL_CAPCP.pdf) (accessed 10.06.2022).

15. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4273–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.2835.
16. Bayani J, Yao CQ, Quintayo MA, Yan F, Haider S, D'Costa A et al. Molecular stratification of early breast cancer identifies drug targets to drive stratified medicine. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:3. DOI: 10.1038/s41523-016-0003-5.
17. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol.* 2021;32(10):1216–35. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.06.023.
18. Thomssen C, Balic M, Harbeck N, Gnant M. St. Gallen/Vienna 2021: A brief summary of the consensus discussion on customizing therapies for women with early breast cancer. *Breast Care (Basel).* 2021;16(2):135–43. DOI: 10.1159/000516114.
19. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656–64. DOI: 10.1093/jnci/djr393.
20. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: Phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:16014. DOI: 10.1038/npjbcancer.2016.14.
21. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: Updated recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2021;113(7):808–19. DOI: 10.1093/jnci/djaa201.
22. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1897–906. DOI: 10.1093/jnci/djt306.
23. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: A prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1067–76. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70387-5.
24. Andre F, Ismaila N, Allison KH, Barlow WE, Collyar DE, Damodar S et al. Biomarkers for adjuvant endocrine and chemotherapy in early-stage breast cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2022;40(16):1816–37. DOI: 10.1200/JCO.22.00069.
25. Yordanova M, Hassan S. The role of the 21-gene recurrence score® assay in hormone receptor-positive, node-positive breast cancer: The Canadian experience. *Curr Oncol.* 2022;29(3):2008–20. DOI: 10.3390/curroncol29030163.

### Информация об авторах

Инесса Михайловна Тележникова – младший научный сотрудник лаборатории инновационной патоморфологии МКНЦ им. А.С. Логинова, младший научный сотрудник отделения морфологической диагностики отдела онкологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Людмила Григорьевна Жукова – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по онкологии МКНЦ им. А.С. Логинова.

Влада Владимировна Кометова – кандидат медицинских наук, заведующая отделением онкопатологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Сергей Германович Хомерики – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории инновационной патоморфологии МКНЦ им. А.С. Логинова.

Николай Сергеевич Карнаухов – кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением МКНЦ им. А.С. Логинова.

Евгения Игоревна Хатькова – врач-онколог дневного стационара онкологического профиля МКНЦ им. А.С. Логинова.

Галия Равилевна Сетдикова – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инновационной патоморфологии МКНЦ им. А.С. Логинова, заведующая отделением морфологической диагностики отдела онкологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

### Author information

Inessa M. Telezhnikova – Junior Researcher, Innovation Pathomorphology Laboratory, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center; Junior Researcher, Diagnostic Morphology Department, Division of Oncology, MF Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute. <https://orcid.org/0000-0002-1491-2882>

Ludmila G. Zhukova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Oncology, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center. <https://orcid.org/0000-0003-4848-6938>

Vlada V. Kometova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Oncopathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-9666-6875>

Sergey G. Khomeriki – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Innovation Pathomorphology Laboratory, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center. <https://orcid.org/0000-0003-4308-8009>

Nikolai S. Karnaukhov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center. <https://orcid.org/0000-0003-0889-2720>

Evgeniya I. Khatkova – Oncologist, Oncology Day Hospital, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center. <https://orcid.org/0000-0002-0259-117X>

Galiya R. Setdikova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Innovation Pathomorphology Laboratory, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center; Head of the Diagnostic Morphology Department, Division of Oncology, MF Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute. <https://orcid.org/0000-0002-5262-4953>

## Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов

А.Т. Абдулжалиев<sup>1</sup>, И.В. Булычева<sup>1</sup>, О.В. Ковалева<sup>1</sup>, Е.А. Сушенцов<sup>1</sup>,  
А.И. Сендерович<sup>2</sup>, А.К. Валиев<sup>1</sup>, Н.Е. Кушлинский<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (ЗООПН) представляют собой редкую гетерогенную группу агрессивных новообразований мезенхимального происхождения, для которой до сих пор не определена взаимосвязь между уровнем экспрессии PD-L1 и прогнозом заболевания. Кроме того, в отношении солидных опухолей данного типа остается неизученной роль клеток опухолевого микроокружения, в частности макрофагов, ассоциированных с опухолью. Цель исследования – оценить степень влияния экспрессии PD-L1 и ядерного маркера макрофагов PU.1 на общую выживаемость (ОВ) и безрецидивную выживаемость (БРВ) у пациентов с ЗООПН.

*Материалы и методы.* В исследование были включены 46 пациентов с ЗООПН, которым в период с 1998 по 2021 год выполняли хирургическое или комбинированное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Проведен анализ клинических и морфологических показателей, изучены результаты хирургического лечения. Анализ экспрессии PD-L1, PU.1 и Ki-67% проводили иммуногистохимическим методом.

*Результаты.* Положительное окрашивание на PD-L1 наблюдалось в 28% исследованных случаев. Экспрессию PU.1 выявили во всех образцах. Обнаружена статистически достоверная корреляция между уровнем экспрессии PU.1 и PD-L1. При медиане наблюдения 37 месяцев положительный PD-L1 статус ассоциирован с более низкой медианой общей и безрецидивной выживаемости в группе пациентов с низкодифференцированными ЗООПН (Grade 3) ( $p=0,0003$  и  $p=0,004$ , соответственно). Медиана общей выживаемости для опухолей с высоким и низким содержанием PU.1+ клеток составила 21 месяц и 78 месяцев, соответственно ( $p<0,0001$ ).

*Заключение.* В данном исследовании впервые описана прогностическая значимость макрофагального маркера PU.1 у пациентов со ЗООПН. Высокий уровень содержания PU.1+ клеток вне зависимости от степени злокачественности, а также экспрессия PD-L1  $>1\%$  у пациентов с опухолями Grade 3 достоверно негативно влияли на ОВ и БРВ. Полученные результаты позволяют использовать анализ экспрессии данных маркеров как прогностических, а также, вероятно, для разработки новых терапевтических возможностей.

**Ключевые слова:** злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов, PD-L1, иммуногистохимическое исследование, PU.1, хирургическое лечение

**Для корреспонденции:** Адиль Тахирович Абдулжалиев. E-mail: AdilNGY@yandex.ru

**Для цитирования:** Абдулжалиев А.Т., Булычева И.В., Ковалева О.В., Сушенцов Е.А., Сендерович А.И., Валиев А.К., Кушлинский Н.Е. Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):44–53. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.44-53.

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

Статья поступила 14.03.2023. Получена после рецензирования 30.03.2023. Принята в печать 10.04.2023.

## PD-L1 and PU.1 expression in malignant peripheral nerve sheath tumors

А.Т. Абдулжалиев<sup>1</sup>, И.В. Булычева<sup>1</sup>, О.В. Ковалева<sup>1</sup>, Е.А. Сушенцов<sup>1</sup>,  
А.И. Сендерович<sup>2</sup>, А.К. Валиев<sup>1</sup>, Н.Е. Кушлинский<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Moscow, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) belong to a rare heterogeneous group of aggressive neoplasms of mesenchymal origin. The relationship between the PD-L1 expression and

development and prognosis of MPNSTs has not yet been determined. In addition, it is yet to explore the role of tumor microenvironment, in particular tumor-associated macrophages, in solid tumors. The aim of the study was to determine the relationship between (1) PD-L1 expression and the nuclear marker of PU.1 expression in stromal cells and (2) overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) in patients with MPNSTs. *Materials and methods.* The retrospective study included 46 adult patients with MPNSTs who underwent surgical or combined treatment from 1998 to 2021 at the N.N. Blokhin Oncology Research Center. We analyzed clinical and morphological parameters as well as the outcomes of surgical treatment. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PD-L1, PU.1, and Ki-67.

*Results.* We found positive PD-L1 staining in 28% of cases. PU.1 expression was observed in all samples. We showed a statistically significant correlation between PU.1 and PD-L1 expression levels. At a median follow-up of 37 months, PD-L1 positive status was associated with a lower median OS and RFS in the group of patients with grade III tumors ( $p=0.0003$  and  $p=0.004$ , respectively). The median OS for tumors with high and low number of PU.1+ cells was 21 and 78 months, respectively ( $p<0.0001$ ).

*Conclusion.* To the best of our knowledge, this is the first study to describe the prognostic value of the macrophage marker PU.1 in patients with MPNST. High levels of PU.1+ cells, regardless of the tumor grade, and PD-L1 expression  $>1\%$  of tumor cells in the patients with poorly-differentiated MPNSTs, produced a negative effect on OS and RFS. The analyzed expression of these markers can be used in prognostic tests and developing novel therapeutic treatment options.

**Keywords:** malignant peripheral nerve sheath tumor, PD-L1 immunohistochemistry, PU.1, surgical treatment

**Corresponding author:** Adil T. Abdulzhaliev. E-mail: AdilNGY@yandex.ru

**For citation:** Abdulzhaliev A.T., Boulytcheva I.V., Kovaleva O.V., Sushentsov E.A., Senderovich A.I., Valiev A.K., Kushlinskii N.E. PD-L1 and PU.1 expression in malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):44–53 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.44-53.

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

**Received** 14.03.2023. **Received in revised form** 30.03.2023. **Accepted** 10.04.2023.

## Введение

Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (ЗООПН) представляют собой гетерогенную высокоагрессивную группу опухолей мягких тканей, встречающихся в основном у взрослых [1]. Около 50% из них возникает у пациентов, страдающих нейрофиброматозом 1-го типа (НФ 1-го типа, или болезнь Реклингхаузена), а 5–10% развивается вторично, после проведенной лучевой терапии [2]. В клинической практике диагноз «злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов» устанавливается на основании классических диагностических признаков, включая экспрессию S-100, SOX-10, H3k27me3 в ассоциации с НФ 1-го типа.

Стандартом лечения ЗООПН остается радикальная хирургическая резекция, в то время как эффективность лучевой и химиотерапии ограничена ввиду вероятности локального рецидива и отдаленных метастазов у половины пациентов [3]. Данные обстоятельства способствуют развитию новых терапевтических стратегий, в частности использованию иммунотерапии для опухолей данного типа [4]. Так, рецептор PD-1 (рецептор запрограммированной клеточной смерти, CD279) и его лиганд PD-L1 являются элементами системы так называемых иммунных контрольных точек, главные задачи которой – регуляция и модулирование иммунного ответа [5]. Для ускользания опухоли от иммунологического надзора опухолевые клетки могут использовать экспрессию PD-L1, который при связывании со своим рецептором блокирует активацию цитотоксических

Т-лимфоцитов [6]. Применение ингибиторов PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб) и PD-L1 (аделиумаб, атезолизумаб) препятствует инактивированию цитотоксических Т-клеток, тем самым преодолевая иммунную супрессию [6].

Несмотря на то, что препараты, направленные на систему PD-1/PD-L1, были одобрены и эффективно применяются при лечении многих злокачественных новообразований, таких как меланома или немелкоклеточный рак легкого, возможность их использования при саркомах мягких тканей остается до конца не определенной вследствие ограниченности имеющихся сведений, ассоциированной с малым числом наблюдений [7]. Кроме того, необходимо выявление дополнительных маркеров, помогающих отбирать пациентов, у которых с наибольшей вероятностью применение иммунотерапии будет наиболее эффективным. Ряд авторов сообщает, что положительная экспрессия PD-L1 коррелирует с худшим прогнозом у пациентов с саркомами мягких тканей, включая ЗООПН [8]. Однако в исследовании L. Davis et al. у пациентов с новообразованиями, развившимися на фоне НФ 1-го и 2-го типа, не было обнаружено связи между экспрессией PD-L1, инфильтрацией CD8+ лимфоцитами и выживаемостью больных [9]. В настоящее время из литературы известно о четырех пациентах с ЗООПН с различными уровнями экспрессии PD-L1, у которых наблюдали полный метаболический ответ на анти-PD-1 терапию [9–11]. Помимо злокачественных опухолей в некоторых исследованиях приводятся данные об увеличении экспрессии PD-L1

в случае плексиформных нейрофибром у пациентов с НФ 1-го типа, считающихся облигатными предшественниками ЗООПН [12].

Для пациентов с саркомами мягких тканей также неизвестна роль компонентов опухолевой стромы, в частности макрофагов, на течение и прогноз заболевания [13]. Полагают, что изучение макрофагов, ассоциированных с опухолью (МАО), следует считать перспективным направлением для определения проопухолевых факторов и биомаркеров, влияющих на клиничко-морфологические характеристики разных онкологических заболеваний. Известно, что МАО способны влиять на различные характеристики воспаления, включая как про-, так и противоопухолевый эффект, пролиферацию опухолевых клеток, формирование и разрушение стромы, ангиогенез [14]. Транскрипционный фактор PU.1, кодируемый геном *Sp1*, играет ключевую роль в клеточной регуляции иммунной системы путем активирования экспрессии генов в развитии клеток миелоидной, эритроидной и В-лимфоидной линий. Экспрессия данного белка является независимым фактором прогноза при таких солидных опухолях, как рак молочной железы и глиома [15, 16]. Также показано, что данный белок можно использовать в качестве иммуногистохимического маркера для выявления макрофагов в опухолях [17, 18]. В исследовании сарком разных типов (14 гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), пять синовиальных сарком, четыре лейомиосаркомы и три других новообразования) показано, что макрофаги обнаружены в 90% (45/50) исследованных опухолей [19]. В другом исследовании The Cancer Genome Atlas (TCGA) на 206 образцах сарком мягких тканей у взрослых высокое содержание макрофагов наблюдали в случае дедифференцированных липосарком, миксофибросарком, недифференцированных плеоморфных сарком (НПС) и редко в случае синовиальных сарком [13].

В данном исследовании проведена комплексная оценка экспрессии PD-L1, ядерного транскрипционного фактора PU.1 и маркера клеточной пролиферации Ki-67 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов.

## Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ исходов заболевания пациентов с ЗООПН, которым проводили хирургическое или комбинированное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 1998 по 2021 год. Гистогенез опухолей подтвержден данными морфологического исследования согласно Международной классификации опухолей мягких тканей (ВОЗ, 2020). Полезными критериями в диагностике ЗООПН явились наличие в анамнезе НФ 1-го типа; локализация новообразований в проекции периферических нервов и спинальных корешков; присутствие ультраструктурных признаков шванновских клеток при положительном окрашивании опухоли с маркерами

S100, SOX10, H3k27me3 при иммуногистохимическом исследовании.

В настоящее исследование были включены 46 пациентов с ЗООПН: 28 женщин (61%) и 18 мужчин (39%). Средний возраст пациентов составил 50,2 года (диапазон от 18 до 83 лет). В зависимости от локализации новообразования распределялись следующим образом: в верхних конечностях – 22% наблюдений, в нижних конечностях – 17%, паравертебрально – 37% и забрюшинно – 24%. Общая характеристика исследованной выборки представлена в таблице 1.

Анализ экспрессии PD-L1 и Ki67 проводили на приборе BenchMark GX Ventana (Ventana Medical Systems, США). Для оценки PD-L1 использовали антитела Anti-PD-L1 (клон РВМ-1А4, «ПраймБиоМед», Россия) в разведении 1:50. Инкубацию проводили в течение 32 минут. Условием положительной экспрессии PD-L1 считалось полное или частичное окрашивание не менее 1% опухолевых и/или иммунных клеток. На основании PD-L1-статуса пациенты были разделены

Таблица 1 | Table 1

### Характеристика пациентов с ЗООПН | Clinical and pathological features of patients with MPNSTs

Характеристика   Indicator	Число пациентов, абс. (отн.)   Number of patients, abs. (rel.)
Возраст, лет   Age, years • <50 • ≥50	23 (50%) 23 (50%)
Пол   Sex • мужской   male • женский   female	18 (39%) 28 (61%)
Размер опухоли, см   Tumor size, cm • ≤5   ≤5 • >5   >5	7 (15%) 39 (85%)
Степень дифференцировки опухоли   Histologic grade • Grade 1 • Grade 2 • Grade 3	12 (26%) 14 (30%) 20 (44%)
Количество PD-L1+ клеток   Number of PD-L1+ cells • <1% • ≥1%	33 (72%) 13 (28%)
Подтип опухоли   Tumor subtype • спорадические   sporadic • НФ-1-ассоциированные   NF-1-associated	36 (78%) 10 (22%)
Индекс Ki-67   Ki-67 index • ≤20% • >20%	24 (52%) 22 (48%)
Характер опухоли   Tumor type • первичная   primary • рецидив   relapse	27 (59%) 19 (41%)

на две группы: с низким уровнем экспрессии, что соответствует негативному PD-L1 статусу (PD-L1 <1% клеток), и с высоким уровнем экспрессии, характерным для положительного PD-L1 статуса (PD-L1  $\geq$ 1% клеток). Пороговое значение в 1% выбрано, исходя из данных литературы для ЗООПН и сарком мягких тканей [6, 20].

Для определения уровня экспрессии Ki-67 использовали антитела anti-Ki-67 (клон 30-9, Ventana Medical Systems, США), инкубацию проводили в течение 16 минут. Экспрессию PD-L1 исследовали в опухолевых и/или иммунных клетках [20]. В качестве контроля для иммуногистохимических реакций использованы ткани миндалины и плаценты.

Экспрессию маркера PU.1 оценивали иммуногистохимическим методом на опухолевых образцах с использованием TrisEDTA, буфер pH 9,0 («ПраймБиоМед», Россия). Инкубацию с антителами к PU.1 (PBM-4G6; «ПраймБиоМед», Россия) в разведении 1:200 проводили в течение 30 минут. Система детекции PrimeVision MS/RB HRP/DAB («ПраймБиоМед», Россия) применялась соответственно инструкции производителя.

Окрашенные готовые препараты анализировали при помощи микроскопа BX53 (Olympus, Япония), камеры INFINITY2-2C (Lumenera, Канада) и программы Infinity analyze (Lumenera, Канада). В каждом образце оценку количества PU.1 положительных клеток проводили в 5 независимых полях зрения при  $\times 400$  прямым подсчетом. Среднее значение количества окрашенных клеток в одном поле зрения указывало на содержание PU.1 в строме опухоли.

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics (выпуск 26.0) (IBM, США). При анализе отдаленных результатов безрецидивной выживаемости считали период от хирургического вмешательства до появления признаков рецидива опухоли, последнего наблюдения или смерти по причине, не связанной с основным заболеванием; общей выживаемостью считали период от хирургического вмешательства до смерти по любой причине. В независимых группах с целью анализа статистически значимых различий применяли критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Анализ выживаемости выполняли по методу Каплана–Мейера с

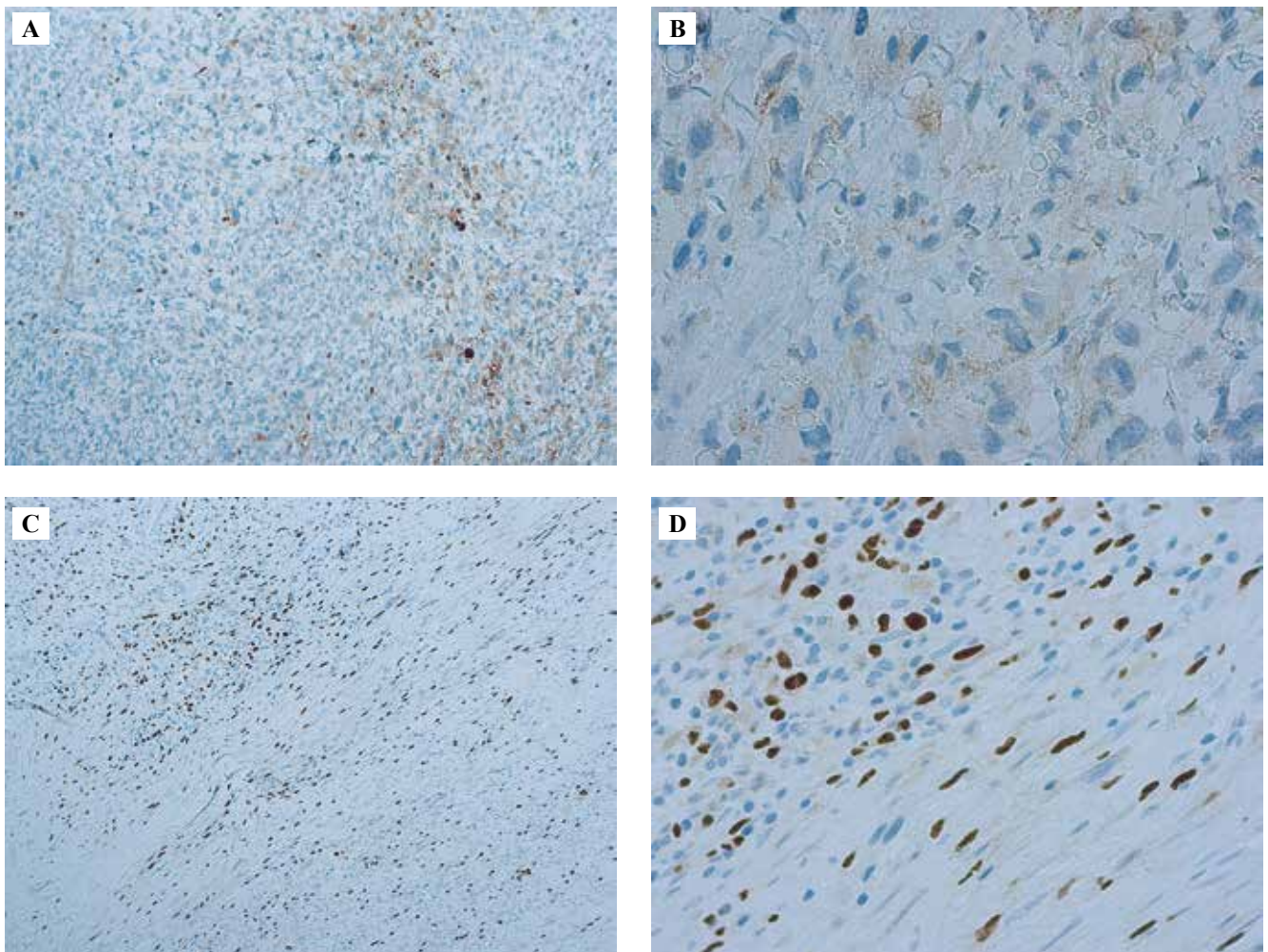


Рис. 1. Экспрессия PD-L1 и PU.1 в образцах ЗООПН. Иммуногистохимическое окрашивание. А, С –  $\times 200$ , В, D –  $\times 400$

Fig. 1. PD-L1 and PU.1 expression in MPNSTs. IHC assay, A, C –  $\times 200$ , B, D –  $\times 400$

использованием log-rank-теста. Для оценки потенциального влияния различных факторов риска на выживаемость дополнительно выполняли многофакторный анализ с использованием непараметрической модели пропорциональных рисков Кокса. Статистически значимым считали результат при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Анализ экспрессии PU.1 в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания

Положительная экспрессия PU.1 выявлена во всех 46 опухолевых образцах ЗООПН (100% случаев). Среднее содержание PU.1+ клеток в 1 поле зрения составило 22 клетки (диапазон 3-61). Образцы ИГХ препаратов PU.1 и PD-L1 отображены на рисунке 1.

Проведен анализ ассоциации содержания PU.1+ клеток в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, содержание PU.1+ клеток не ассоциировано с клиническими характеристиками, за исключением уровня

экспрессии PD-L1 ( $p=0,004$ ) и Ki-67% ( $p=0,027$ ). Медиана индекса пролиферации (Ki-67%) составила 18%, диапазон значений варьировал от 3% до 70%.

### Анализ экспрессии PD-L1 в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания

На следующем этапе исследования провели анализ клинической значимости экспрессии PD-L1 у пациентов с ЗООПН. В результате исследования высокий уровень экспрессии PD-L1  $\geq 1\%$  наблюдали в 13 случаях (28%), в то время как отрицательная реакция, соответствующая негативному статусу PD-L1 (PD-L1  $< 1\%$ ), встречалась в 33 случаях (72%). Общие характеристики изучаемой группы пациентов в зависимости от статуса PD-L1 представлены в таблице 3.

Как видно из представленных данных, в целом экспрессия PD-L1 практически не ассоциирована с клиническими характеристиками, за исключением степени дифференцировки опухоли. Высокую экспрессию PD-L1 чаще наблюдали в низкодифференцированных опухолях (Grade 3) по сравнению с высокодифференцированными (Grade 1).

Таблица 2 | Table 2

Ассоциация содержания PU.1+ клеток с клинико-морфологическими характеристиками пациентов | Association between PU.1+ cells and clinical and morphological characteristics of the patients

Характеристика   Indicator	Число пациентов, n (%)   Number of patients, n (%)	PU.1 медиана (мин.–макс.)   PU.1 median (min.–max.)	p-value
Возраст, лет   Age, years			
• <50	23 (50%)	19 (4–61)	0,709
• $\geq 50$	23 (50%)	16,5 (3–44)	
Пол   Sex			
• мужской   male	18 (39%)	17,5 (3–46)	0,973
• женский   female	28 (61%)	16,5 (3–55)	
Размер опухоли, см   Tumor size, cm			
• $\leq 5$   $\leq 5$	7 (15%)	16,5 (5–41)	0,472
• $> 5$   $> 5$	39 (85%)	25 (3–61)	
Степень дифференцировки   Histologic Grade			
• Grade 1/Grade 2	12 (26%)/14 (30%)	16,5 (4–49)	0,597
• Grade 3	20 (44%)	20 (3–61)	
Количество PD-L1+ клеток   Number of PD-L1+ cells			
• $< 1\%$	33 (72%)	16 (3–42)	0,004*
• $\geq 1\%$	13 (28%)	26,2 (5–61)	
Подтип опухоли   Tumor subtype			
• спорадические   sporadic	36 (78%)	18,9 (3–55)	0,743
• NF-1-ассоциированные   NF-1-associated	10 (22%)	19,5 (3–40)	
Индекс Ki-67, %   Ki-67 index, %			
• $\leq 20\%$	24 (52%)	13,8 (4–35)	0,0002*
• $> 20\%$	22 (48%)	24,4 (3–61)	
Характер опухоли   Tumor type			
• первичная   primary	27 (59%)	18,9 (4–40)	0,902
• рецидив   relapse	19 (41%)	18,8 (3–55)	

\* Статистически значимо | Statistically significant



Таблица 3 | Table 3

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

Характеристика   Indicator	PD-L1 <1% n=33	PD-L1 ≥1% n=13	p-value
Возраст, лет   Age, years • <50 • ≥50	15 (33%) 18 (39%)	8 (17%) 5 (11%)	0,514
Пол   Sex • мужской   male • женский   female	12 (26%) 21 (46%)	6 (13%) 7 (15%)	0,738
Размер опухоли, см   Tumor size, cm • ≤5 • >5	6 (13%) 27 (59%)	1 (2%) 12 (26%)	0,654
Степень дифференцировки   Histologic Grade • Grade 1 • Grade 2 • Grade 3	12 (26%) 8 (18%) 13 (28%)	0 6 (13%) 7 (15%)	0,036
Характер опухоли   Tumor type • первичная   primary • рецидив   relapse	21 (46%) 12 (26%)	6 (13%) 7 (15%)	0,278
Подтип опухоли   Tumor subtype • спорадические   sporadic • NF-1-ассоциированные   NF-1-associated	28 (61%) 5 (11%)	8 (17%) 5 (11%)	0,084
Индекс Ki-67, %   Ki-67 index, % • ≤20% • >20%	18 (39%) 15 (33%)	6 (13%) 7 (15%)	0,607

Анализ прогностической значимости экспрессии  
PU.1 и PD-L1 в ЗООПН

Для определения прогностической значимости PU.1+ клеток при ЗООПН пациенты были разделены на две группы – с низким (<40) и высоким (>40) содержанием клеток в поле зрения. Показано, что при высоком содержании PU.1+ клеток наблюдаются статистически значимое снижение как общей выживаемости (ОВ) пациентов, так и безрецидивной выживаемости (БРВ). Медиана ОВ для опухолей с высоким содержанием PU.1+ клеток составила 21 месяц, в то время как в группе с низким содержанием PU.1+ клеток – 78 месяцев ( $p<0,0001$ ). БРВ пациентов с ЗООПН с высоким содержанием PU.1+ клеток составила 6,5 месяца и 78 месяцев для опухолей с низким содержанием PU.1+ клеток ( $p<0,0001$ ) (рис. 2).

Как видно из представленных графиков, количество PU.1+ клеток, инфильтрирующих опухоль, является значимым прогностическим фактором при ЗООПН. Так, впервые показано, что высокое содержание макрофагов в строме опухолей – статистически значимо неблагоприятный прогностический фактор при анализе как ОВ, так и БРВ.

Далее проведен анализ прогностической значимости экспрессии PD-L1 в ЗООПН. При медиане на-

блюдения 37 месяцев ОВ пациентов с положительным PD-L1 статусом составила 24 месяца против 78 месяцев в группе пациентов с уровнем экспрессии PD-L1 <1% ( $p=0,0002$ ) (рис. 3). БРВ у пациентов с положительным и негативным PD-L1 статусом составила 9 и 78 месяцев, соответственно ( $p=0,004$ ).

Выполнен многофакторный статистический анализ прогностической значимости исследованных белков, результаты которого представлены в таблице 4.

Проведенный регрессионный анализ Кокса показал, что высокое содержание PU.1+ клеток и высокий уровень экспрессии PD-L1 при ЗООПН являются независимыми факторами прогноза, ассоциированными со снижением выживаемости. Таким образом, в данном исследовании представлены два прогностических маркера ЗООПН.

С учетом того, что степень дифференцировки опухоли – независимый прогностический фактор, нами дополнительно проведен анализ выживаемости пациентов в зависимости от статуса экспрессии PD-L1 и PU.1 по отдельности в группах опухолей разной степени злокачественности. В данной работе высокодифференцированные (Grade 1) PD-L1 положительные ЗООПН не выявлены. В случае умеренно дифференцированных опухолей не было получено статистически

значимой разницы в показателях ОБ и БРВ в зависимости от экспрессии PD-L1. У пациентов с низкодифференцированной ЗООПН (Grade 3) медиана общей выживаемости в группе опухолей с высоким уровнем экспрессии PD-L1 составила 14 месяцев, в то время как с низким – 60 месяцев ( $p=0,0003$ ), и это свидетельствует о том, что экспрессия PD-L1 является неблагоприятным прогностическим фактором низкодифференцированных (Grade 3) ЗООПН.

При анализе прогностической значимости макрофагальной инфильтрации в зависимости от опухоле-

вой дифференцировки показано, что для всех опухолей оболочек периферических нервов вне зависимости от степени злокачественности наличие PU.1+ клеток – неблагоприятный прогностический фактор течения заболевания.

На последнем этапе исследования проведен корреляционный анализ между количеством PU.1+ клеток и статусом экспрессии PD-L1. Проведенный анализ показал, что экспрессия PD-L1 прямо коррелирует с содержанием макрофагов в строме исследуемых опухолей ( $r=0,417$ ;  $p=0,004$ ), и это свидетельствует о том, что именно макро-

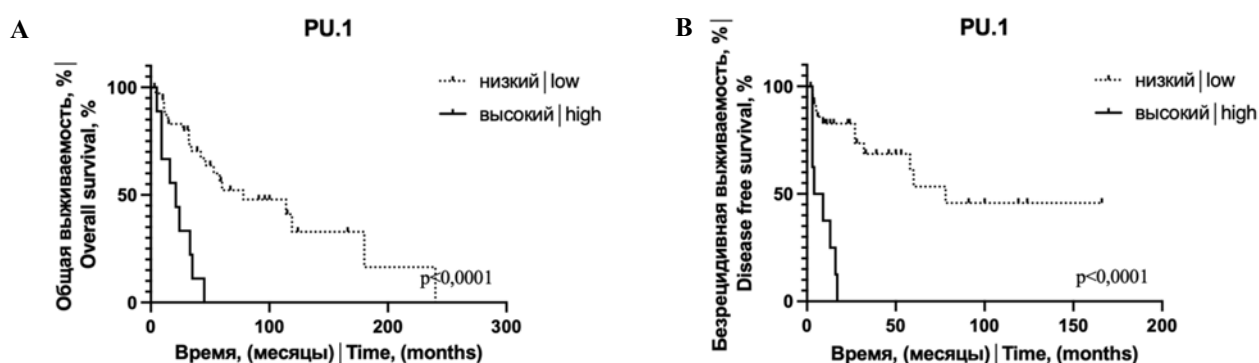


Рис. 2. Анализ общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от содержания PU.1+ клеток при ЗООПН по методу Каплана–Мейера (низкий уровень – менее 40 клеток, высокий уровень – более 40 клеток)

Fig. 2. Analysis of overall and recurrence-free survival depending on the presence of PU.1+ cells in MPNSTs, Kaplan–Meier curves (low – fewer than 40 cells, high – more than 40 cells)

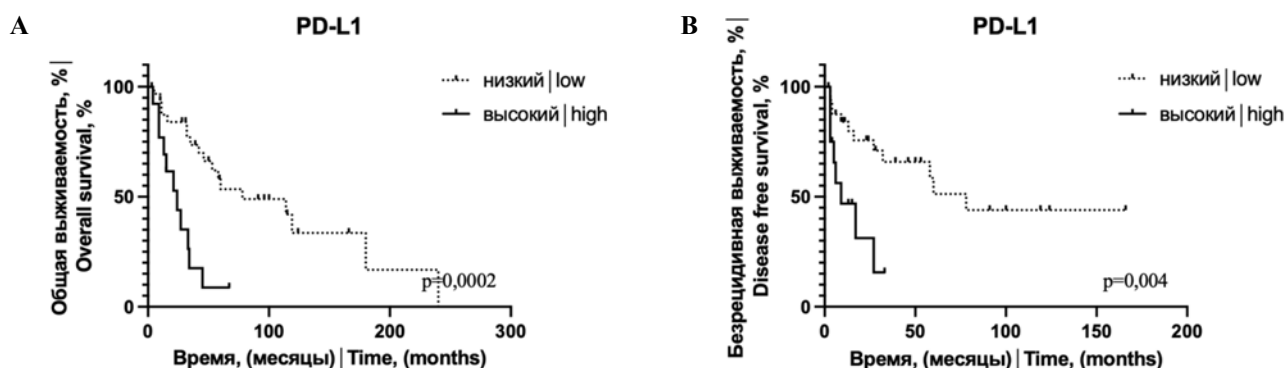


Рис. 3. Анализ общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от экспрессии PD-L1 при ЗООПН по методу Каплана–Мейера (низкий уровень – отрицательный PDL-статус (PD-L1 <1% клеток), высокий уровень – положительный PDL-статус (PD-L1 ≥1% клеток))

Fig. 3. Analysis of overall and recurrence-free survival depending on the presence of PD-L1+ cells in MPNSTs, Kaplan–Meier curves [(low – negative PDL-status (PD-L1 <1% cells), high – positive PDL-status (PD-L1 ≥1% cells)]

Таблица 4 | Table 4

Статистический анализ прогностической значимости PU.1 |  
Statistical analysis of prognostic significance of PU.1

Параметр   Indicator	Однофакторный анализ   Univariate analysis			Многофакторный анализ   Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
PD-L1 (высокий/низкий)   PD-L1 (high/low)	3,573	1,275–10,02	p=0,0002	3,997	1,608–9,944	0,0026
PU.1 стромы (высокий/низкий)   PU.1 stroma (high/low)	4,392	1,254–15,38	p<0,0001	5,453	2,036–14,46	0,0006

фаги опухолевого микроокружения являются основным типом клеток, экспрессирующих PD-L1.

### Обсуждение

Известно, что ЗООПН характеризуются агрессивным клиническим течением и сложным генетическим профилем. Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов, в том числе ассоциированные с НФ 1-го типа, для которых в настоящее время отсутствуют эффективные стандарты лечения, имеют неблагоприятный прогноз, а их хирургическая резекция сопряжена с высоким риском рецидива [21]. Невзирая на большой массив имеющихся данных о влиянии опухолевого микроокружения на прогноз и течение заболевания, в настоящий момент роль макрофагальной инфильтрации ЗООПН остается неизвестной. Несмотря на успехи иммунотерапии многих солидных опухолей с использованием препаратов, влияющих на контрольные точки иммунитета, для лекарственного лечения сарком мягких тканей значительных изменений не произошло, и использование данных агентов не показало обнадеживающих результатов [22, 23].

В представленной работе впервые в нашей стране проведен анализ клинической и прогностической значимости PD-L1 и транскрипционного фактора PU.1 у пациентов с ЗООПН. Для выявления макрофагов в опухолях нами использован ядерный транскрипционный фактор PU.1, который благодаря своей ядерной локализации в отличие от других маркеров макрофагов упрощает визуализацию этого типа клеток и их количественную оценку [17, 18].

В настоящей работе высокое количество PU.1+ клеток явилось значимым фактором неблагоприятного прогноза вне зависимости от дифференцировки опухоли, а также достоверно коррелировало с положительной экспрессией PD-L1, что подтверждает макрофагальную экспрессию данного белка. В целом, высокое содержание макрофагов в опухоли является маркером неблагоприятного прогноза при различных типах опухолей, в том числе и в случае сарком мягких тканей [24, 25].

Для ЗООПН прогностическая значимость макрофагов еще не определена ввиду недостаточного числа исследований. Нами впервые показано, что использование PU.1 в качестве панмакрофагального маркера позволяет эффективно выявлять макрофаги в опухолях подобного типа и их высокое содержание однозначно ассоциировано с неблагоприятным прогнозом.

На следующем этапе работы дополнительно проанализировали значимость экспрессии PD-L1 в ЗООПН. Согласно данным исследований, представленным в литературе, экспрессия PD-L1 зависит от гистологического типа опухоли [26]. Также в литературе представлены результаты по экспрессии PD-L1 в ЗООПН [23]. В самом крупном опубликованном исследовании, посвященном поиску новых терапевтических мишеней и прогностических маркеров, включавшем более 2500 пациентов с различными типами сарком (22 гисто-

логических подтипа), экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках встречалась в 50% случаев сарком мягких тканей, однако ее прогностическая значимость не выявлена [27]. Напротив, в работе J. Kim et al., охватывающей 105 случаев сарком мягких тканей, из которых шесть случаев ЗООПН, положительная экспрессия PD-L1, обнаруженная в 58% всех исследованных сарком и в трех (50%) случаях ЗООПН, была ассоциирована с поздней стадией заболевания, более низкой дифференцировкой опухоли, а также более коротким периодом БРВ и ОВ [28], что частично согласуется с полученными нами результатами. Одни исследователи показывают полное отсутствие экспрессии PD-L1 [29] в образцах ЗООПН, в то время как другие демонстрируют показатели частоты экспрессии маркера в 13–17% исследованных образцов [6, 9], что сопоставимо с нашими результатами. В работе E. Shurell et al. окрашивание не менее 1% наблюдалось в 3% доброкачественных опухолей и в 17% ЗООПН, однако ассоциации между экспрессией PD-L1 с выживаемостью пациентов не выявлено. Помимо этого авторы показали, что экспрессия PD-L1 чаще выявляется в образцах ЗООПН по сравнению с доброкачественными опухолями, в то время как в исследовании K. Haworth et al. существенной разницы не обнаружено. Таким образом, прогностическая значимость экспрессии PD-L1 для ЗООПН в настоящее время остается спорной. В проведенном нами исследовании положительный PD-L1 статус в клетках ЗООПН и опухолевого микроокружения был ассоциирован с неблагоприятным прогнозом, причем в группе опухолей высокой степени злокачественности. Кроме того, необходимо отметить отсутствие экспрессии PD-L1 в образцах опухолей низкой степени злокачественности.

### Заключение

В представленном исследовании впервые описана прогностическая значимость макрофагального маркера PU.1 у пациентов со злокачественными опухолями из оболочек периферических нервов. Ядерная локализация данного белка делает его удобным для одновременного окрашивания совместно с другими маркерами, экспрессирующимися в цитоплазме или на мембране, например PD-L1. Одновременный анализ экспрессии PD-L1 в иммунных клетках микроокружения может стать новым перспективным прогностическим маркером для опухолей данного типа, что подтверждает наша работа. Экспрессия PD-L1 >1% у пациентов с низкодифференцированными (Grade 3) вариантами злокачественных опухолей из оболочек периферических нервов, а также высокий уровень экспрессии PU.1 вне зависимости от степени злокачественности в нашем исследовании статистически значимо негативно влияли на прогноз у пациентов с такими новообразованиями. Полученные результаты позволяют использовать анализ экспрессии представленных маркеров как прогностических факторов, а также, вероятно, для разработки новых терапевтических возможностей.

**Вклад авторов**

Концепция и дизайн исследования – И.В. Булычева,  
 О.В. Ковалева, Н.Е. Кушлинский.  
 Сбор и обработка материала – А.Т. Абдулжалиев, Е.А. Сушенцов,  
 А.И. Сендерович.  
 Написание текста – А.Т. Абдулжалиев.  
 Редактирование – А.Т. Абдулжалиев, А.К. Валиев.

**Author contributions**

Conceived the study and designed the experiment – I.V. Boulytcheva,  
 O.V. Kovaleva, N.E. Kushlinskii.  
 Collected the data and performed the analysis – A.T. Abdulzhaliev,  
 E.A. Sushentsov, A.I. Senderovich.  
 Wrote the paper – A.T. Abdulzhaliev.  
 Edited the manuscript – A.T. Abdulzhaliev, A.K. Valiev.

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

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

**Литература/References**

- Prieto-Granada CN, Wiesner T, Messina JL, Jungbluth AA, Chi P, Antonescu CR. Loss of H3K27me3 expression is a highly sensitive marker for sporadic and radiation-induced MPNST. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(4):479–89. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000564.
- Marjanska A, Galazka P, Wysocki M, Styczynski J. New frontiers in therapy of peripheral nerve sheath tumors in patients with neurofibromatosis type 1: Latest evidence and clinical implications. *Anticancer Res.* 2020;40(4):1817–31. DOI: 10.21873/anticancer.14136.
- James AW, Shurell E, Singh A, Dry SM, Eilber FC. Malignant peripheral nerve sheath tumor. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(4):789–802. DOI: 10.1016/j.soc.2016.05.009.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015;348(6230):56–61. DOI: 10.1126/science.aaa8172.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1974–82. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358.
- Shurell E, Singh AS, Crompton JG, Jensen S, Li Y, Dry S et al. Characterizing the immune microenvironment of malignant peripheral nerve sheath tumor by PD-L1 expression and presence of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes. *Oncotarget.* 2016;7(39):64300–8. DOI: 10.18632/oncotarget.11734.
- Gong J, Chehrrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):8. DOI: 10.1186/s40425-018-0316-z.
- Hashimoto K, Nishimura S, Ito T, Akagi M. Characterization of PD-1/PD-L1 immune checkpoint expression in soft tissue sarcomas. *Eur J Histochem.* 2021;65(3):3203. DOI: 10.4081/ejh.2021.3203.
- Davis LE, Nicholls LA, Babiker HM, Liau J, Mahadevan D. PD-1 inhibition achieves a complete metabolic response in a patient with malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(9):1396–400. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0072.
- Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E. Complete response to pembrolizumab in a patient with malignant peripheral nerve sheath tumor: The first case reported. *J Appl Pharm Sci.* 2017;7(10):182–4. DOI: 10.7324/JAPS.2017.71026.
- Mei J, Wang H, Fan H, Ding J, Xu J. Case Report: Successful immunotherapy improved the prognosis of the unfavorable subset of cancer of unknown primary. *Front Immunol.* 2022;13:900119. DOI: 10.3389/fimmu.2022.900119.
- Haworth KB, Arnold MA, Pierson CR, Choi K, Yeager ND, Ratner N et al. Immune profiling of NF1-associated tumors reveals histologic subtype distinctions and heterogeneity: Implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 2017;8(47):82037–48. DOI: 10.18632/oncotarget.18301.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell.* 2017;171(4):950–965.e28. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.014.
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992;13(7):265–70. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90008-U.
- Lin J, Liu W, Luan T, Yuan L, Jiang W, Cai H et al. High expression of PU.1 is associated with Her-2 and shorter survival in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):8220–6. DOI: 10.3892/ol.2017.7204.
- Xu Y, Gu S, Bi Y, Qi X, Yan Y, Lou M. Transcription factor PU.1 is involved in the progression of glioma. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3753–9. DOI: 10.3892/ol.2018.7766.
- Matsubara E, Komohara Y, Esumi S, Shinchi Y, Ishizuka S, Mito R et al. SPP1 derived from macrophages is associated with a worse clinical course and chemo-resistance in lung adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2022;14(18):4374. DOI: 10.3390/cancers14184374.
- Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю и др. PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(2):32–39. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39. Kovaleva OV, Grachev AN, Podlesnaya PA, Rashidova MA, Samoilova DV, Sokolov NYu et al. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer. Clinical and experimental morphology. 2021;10(2):32–39 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39.
- Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: A meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012;7(12):e50946. DOI: 10.1371/journal.pone.0050946.
- Бугаев В.Е., Никулин М.П., Поспехова Н.И., Сафронова В.М., Кокосадзе Н.В., Божченко Я.А. и др. Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами. Успехи молекулярной онкологии. 2019;6(3):37–48. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-37-48. Bugaev VE, Nikulin MP, Pospekhova NI, Safronova VM, Kokosadze NV, Bozhchenko YA et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and evaluation of microsatellite instability status in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas. *Advances in Molecular Oncology.* 2019;6(3):37–48 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-37-48.
- Varin J, Poulain L, Hivelin M, Nusbaum P, Hubas A, Laurendeau I et al. Dual mTORC1/2 inhibition induces anti-proli-

- ferative effect in NF1-associated plexiform neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumor cells. *Oncotarget*. 2016;7(24):35753–67. DOI: 10.18632/oncotarget.7099.
22. Toulmonde M, Penel N, Adam J, Chevreau C, Blay JY, Le Cesne A et al. Use of PD-1 targeting, macrophage infiltration, and IDO pathway activation in sarcomas a phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(1):93–7. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.1617.
  23. D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): Two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):416–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30006-8.
  24. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Макарова Э.И., Бежанова С.Д., Стилиди И.С., Матвеев В.Б. и др. Прогностическая значимость sPD-1/sPD-L1 при раке почки в зависимости от фенотипа опухолевых и стромальных клеток. *Онкоурология*. 2022;18(2):17–28. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28. Kovaleva OV, Gratchev AN, Makarova EI, Bezhanova SD, Stilidi IS, Matveev VB et al. Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells. *Cancer Urology*. 2022;18(2):17–28 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28.
  25. Fujiwara T, Healey J, Ogura K, Yoshida A, Kondo H, Hata T et al. Role of tumor-associated macrophages in sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1086. DOI: 10.3390/cancers13051086.
  26. Orth MF, Buecklein VL, Kampmann E, Subklewe M, Noessner E, Cidre-Aranaz F et al. A comparative view on the expression patterns of PD-L1 and PD-1 in soft tissue sarcomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(7):1353–62. DOI: 10.1007/s00262-020-02552-5.
  27. Movva S, Wen W, Chen W, Millis SZ, Gatalica Z, Reddy S et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: Identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget*. 2015;6(14):12234–47. DOI: 10.18632/oncotarget.3498.
  28. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013;8(12):e82870. DOI: 10.1371/journal.pone.0082870.
  29. D'Angelo SP, Shoushtari AN, Agaram NP, Kuk D, Qin LX, Carvajal RD et al. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol*. 2015;46(3):357–65. DOI: 10.1016/j.humphath.2014.11.001.

### Информация об авторах

Адиль Тахирович Абдулжалиев – аспирант онкологического отделения хирургических методов лечения № 9 (вертебральной онкологии) отдела общей онкологии Научно-исследовательского института клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Ирина Владиславовна Булычева – доктор медицинских наук, врач-патологоанатом отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

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

Евгений Александрович Сушенцов – кандидат медицинских наук, заведующий онкологическим отделением хирургических методов лечения № 14 (онкоортопедии) отдела общей онкологии Научно-исследовательского института клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Анастасия Ильинична Сендерович – кандидат медицинских наук, врач – лабораторный генетик лаборатории иммуноморфологии и молекулярной генетики ЦКБ с поликлиникой.

Аслан Камратдинович Валиев – доктор медицинских наук, заведующий отделом общей онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

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

### Author information

Adil T. Abdulzhaliyev – Postgraduate Student, Oncological Department of Surgical Treatment Methods No. 9 (Spinal Oncology), General Oncology Division, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0001-9156-9822>

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

Olga V. Kovaleva – Dr. 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>

Evgeny A. Sushentsov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Oncological Department of Surgical Treatment Methods No. 14 (Orthopedic Oncology), General Oncology Division, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>

Anastasia I. Senderovich – Cand. Sci. (Med.), Laboratory Geneticist, Laboratory of Immunomorphology and Molecular Genetics, Central Clinical Hospital with a Polyclinic. <https://orcid.org/0000-0003-2213-5785>

Aslan K. Valiev – Dr. Sci. (Med.), Head of the General Oncology Division, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. <https://orcid.org/0000-0002-2038-3729>

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>

## Патоморфологическая диагностика первичного кожного CD4-позитивного Т-клеточного лимфопролиферативного заболевания из мелких и средних клеток: серия из 28 случаев

А.А. Шерстнев, А.М. Ковригина, Л.Г. Горенкова

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский институт гематологии Минздрава России, Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Первичное кожное CD4+ лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток (ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток) – новая нозологическая единица, выделенная в классификации ВОЗ 2017 года. Цель исследования – охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические признаки ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток.

**Материалы и методы.** В исследовании изучено 28 биоптатов кожи пациентов с ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких и средних клеток (13 мужчин и 15 женщин). На срезах с парафиновых блоков были проведены гистологические и иммуногистохимические исследования.

**Результаты.** При проведении гистологического исследования характер роста инфильтрата кожи был представлен нодулярным, очагово-диффузным, диффузным типом. В каждом случае определялась выраженная лимфоидная инфильтрация Т-клетками с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh-иммунофенотип), количество В-клеток варьировало.

**Заключение.** ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких и средних клеток – редкое заболевание, которое требует дальнейшего изучения для определения критериев диагностики и лечения.

**Ключевые слова:** первичное кожное CD4+ лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток, Tfh-клетки, иммунофенотип

**Для корреспонденции:** Андрей Алексеевич Шерстнев. E-mail: sherstnevandrejj@mail.ru

**Для цитирования:** Шерстнев А.А., Ковригина А.М., Горенкова Л.Г. Патоморфологическая диагностика первичного кожного CD4-позитивного Т-клеточного лимфопролиферативного заболевания из мелких и средних клеток: серия из 28 случаев. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):54–60. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.54-60.

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

Статья поступила 10.03.2023. Получена после рецензирования 30.03.2023. Принята в печать 10.04.2023.

## Pathomorphological diagnosis of primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative disorder: a 28-case series

А.А. Sherstnev, А.М. Kovrigina, L.G. Gorenkova

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Primary cutaneous CD4+ lymphoproliferative disorder of small and medium cells (PC CD4+ T-LPD small/medium cell) is a new entity identified in the WHO classification published in 2017. The aim of the research was to characterize morphological and immunohistochemical features of PC CD4+ T-LPD small/medium cell.

**Materials and methods.** The study examined 28 skin biopsies from 13 males and 15 females with PC CD4+ T-LPD small/medium cell using histological and immunohistochemical methods.

**Results.** We detected growth pattern to be of nodular, focal–diffuse, and diffuse types. Each case was characterized by significant T-cell lymphoid infiltration with an immunophenotype of follicular T-helper cells (Tfh-immunophenotype), the number of B-cells varying.

**Conclusion.** PC CD4+ T-LPD from small and medium cells is a rare disease that requires further study to determine the criteria for diagnosis and treatment.

**Keywords:** primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder, T follicular helper cells, immunophenotype

**Corresponding author:** Andrei A. Sherstnev. E-mail: sherstnevandrejj@mail.ru

**For citation:** Sherstnev A.A., Kovrigina A.M., Gorenkova L.G. Pathomorphological diagnosis of primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative disorder: a 28-case series. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):54–60 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.54-60.

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

**Received** 10.03.2023. **Received in revised form** 30.03.2023. **Accepted** 10.04.2023.

## Введение

Первичное кожное CD4+ Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток (ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток) – одна из новых нозологических форм классификации ВОЗ 2017 года [1], включает кожные поражения в виде солитарных узлов, крайне редко – множественных пятен на коже лица, шеи и верхней части туловища [2]. Прогноз заболевания благоприятный. Возможна спонтанная ремиссия после иссечения [1]. Дифференциальную диагностику следует проводить с первичными Т-клеточными лимфомами, кожной лимфоидной гиперплазией (В- и Т-клеточная псевдолимфома кожи) и первичной кожной лимфомой из клеток маргинальной зоны.

Первое упоминание о ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток встречается в обновленной Кильской классификации (1986–1992). ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток имело название «плеоморфная первичная Т-клеточная лимфома из мелких клеток» [3]. В классификации первичных лимфом кожи Европейской организации по исследованию и лечению злокачественных опухолей (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) 1997 года эта нозология была отнесена к плеоморфной Т-клеточной лимфоме из мелких/средних клеток [4]. В 2008 году в классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной природы ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток была описана как первичная кожная CD4+ Т-клеточная лимфома и характеризовалась пан-Т-клеточным иммунофенотипом, индолентным течением. Впоследствии, с расширением знаний о популяциях Т-хелперов, в том числе фолликулярных (Т follicular helper cells, Tfh), в лимфоидной популяции ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток был выявлен Tfh-иммунофенотип. Вместе с тем генетические аномалии/мутации в генах, свойственные нодальным Т-клеточным лимфомам с иммунофенотипом Tfh, обнаружены не были. На основе полученных данных высказано предположение, что ограниченный клональный ответ неизвестной этиологии, определяемый при первичной кожной CD4+ Т-клеточной лимфоме, не отвечает критериям злокачественности, данные кожные поражения имеют неопределенный злокачественный потенциал, и нозология была отнесена к первичным кожным лимфопролиферативным заболеваниям [5].

Проблема диагностики обусловлена неоднородностью группы, а также возможностью развития в коже разнообразных доброкачественных лимфоидных гиперпластических процессов, симулирующих

злокачественные опухоли. Цель исследования – охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические особенности ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток.

## Материалы и методы

Исследование проведено на базе патологоанатомического отделения НМИЦ гематологии Минздрава России.

Материалом для морфологического и иммуногистохимического исследования послужили биоптаты кожи из очага поражения (пятно или узловое новообразование) 28 пациентов с диагнозом «первичное кожное CD4+ лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток» (в соответствии с пересмотренной классификацией ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей 2017 года). Диагноз был поставлен на основании клинико-anamnestических данных и результатов морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследования в патологоанатомическом отделении НМИЦ гематологии.

### Морфологическое исследование

Для проведения морфологического исследования использовалось окрашивание гематоксилином и эозином.

При гистологическом исследовании морфологического субстрата заболевания оценивали характер роста, клеточный состав инфильтрата.

### Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполнено с использованием антител к CD3, CD4, PD-1, ICOS, CD20. Характеристика антител представлена в таблице 1.

ИГХ окрашивание проводили на иммунопейнере Leica Bond-Max (Leica Microsystems, Германия) по стандартной методике IHC protocol F с применением готовой системы детекции. Завершающая проводка включала в себя поэтапное инкубирование срезов в этаноле и ксилоле. Заключение срезов под покровные стекла было выполнено с использованием монтирующей среды Surgipath Sub-X (Leica Biosystems, Германия)

## Результаты

В исследование были включены 28 пациентов в возрасте от 23 до 75 лет, медиана возраста – 51,5 года, соотношение мужчин и женщин 1:1,15 (13 мужчин

Характеристика антител, используемых для иммуногистохимического исследования |  
 Characteristics of antibodies for immunohistochemical assay

Наименование   Name	Клон   Clone	Фирма (страна)   Company (country)	Разведение   Dilution
CD3	LN10	Leica Biosystems (Германия   Germany)	RTU
CD4	4B12	Leica Biosystems (Германия   Germany)	RTU
PD-1 (CD279)	NAT105	Cell Marque (США   USA)	1:20
ICOS (CD278)	SP98	Invitrogen (США   USA)	1:100
CD20	L26	Leica Biosystems (Германия   Germany)	1:100

и 15 женщин). Диагноз «первичное кожное CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток» верифицирован на основании анамнестических и клинических данных с учетом локализации очага поражения кожи: на голове – 11 пациентов (39,3%), на туловище – 11 пациентов (39,3%), на верхних и нижних конечностях – два (7,1%) и три пациента (10,7%), соответственно (табл. 2). Макроскопически новообразования у всех пациентов оказались сходны и требовали проведения дифференциальной диагностики с кожными псевдолимфомами. Кожные высыпания были представлены в основном солитарными выступающими над поверхностью кожи папулами розоватого цвета; в одном случае отмечалось преимущественное вовлечение подкожно-жировой клетчатки (рис. 1). Основным способом диагностики и лечения заболевания у данных пациентов было радикальное удаление с последующим гистологическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим исследованием. Дополнительной терапии не было, так как при проведении большинству пациентов последую-

щей ПЭТ/КТ новые опухолевые очаги не обнаружены. За период наблюдения (два года – с 2019-го по 2022-й) рецидивы не отмечены.

У 23 пациентов обнаружен единичный очаг, у двух – множественные очаги, у трех число новообразований кожи неизвестно.

При проведении гистологического исследования отмечен нодулярный (11 случаев, 39,3%), очагово-диффузный (шесть случаев, 21,4%) и диффузный (11 случаев, 39,3%) инфильтрат из клеток небольшого (15 наблюдений, 53,6%) и среднего (13 наблюдений, 46,4%) размера. Среди лимфоидного инфильтрата определялись гистиоциты, зрелые плазматические клетки (13 наблюдений, 46,4%), значительная примесь эозинофильных (четыре наблюдения, 14,3%) и нейтрофильных (семь наблюдений, 25%) гранулоцитов. В 14 случаях стенки сосудов были инфильтрированы мелкими лимфоидными клетками. Поражение гиподермы отмечалось в 19 наблюдениях (67,9%). В исследованных случаях признаки эпидермотропизма

Таблица 2 | Table 2

Локализация новообразований кожи у пациентов |  
 Location of skin neoplasms

Локализация   Location	Число пациентов   Number of patients
Голова   Head	11
Туловище   Body	11
Верхние конечности   Upper extremities	2
Нижние конечности   Lower extremities	3



Рис. 1. Первичное кожное CD4+ лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток

Fig. 1. Primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative disorder



не обнаружены. Явления экзоцитоза встречались в 21 случае (75%) (рис. 2, 3).

По результатам иммуногистохимического исследования в морфологическом субстрате преобладала Т-клеточная лимфоидная популяция CD4<sup>+</sup> из небольших клеток (мембранная реакция), CD3<sup>+</sup> (мембранная реакция) с экспрессией Tfh (PD-1<sup>+</sup>, ICOS<sup>+</sup>) (рис. 4–6).

В-клеточная популяция CD20<sup>+</sup> составила 10–70% реактивного микроокружения. Во всех наблюдениях В-клетки были расположены разрозненно и в виде скоплений небольшого и среднего размера, присутствовали крупные В-клетки. В гиподерме разного размера скопления В-клеток отмечались в 17 случаях из 18 (94%), что, по-видимому, является характерной

особенностью данного лимфопролиферативного заболевания кожи.

Экспрессия ICOS (индуцибельный костимулятор Т-клеток) отмечалась в от 25% до 80% клеток лимфоидного инфильтрата, представленных клетками разного размера. ICOS-позитивные клетки были расположены разрозненно (24 случая), периваскулярно в виде небольших кластеров (22 случая) и/или крупных скоплений (шесть случаев). В подкожно-жировой клетчатке ICOS-позитивные скопления встречались только в трех случаях (11,1%).

PD1 – рецептор программируемой клеточной гибели, снижает активацию Т-клеточного иммунного ответа. Экспрессия антител к PD-1 отмечалась в 15–35%

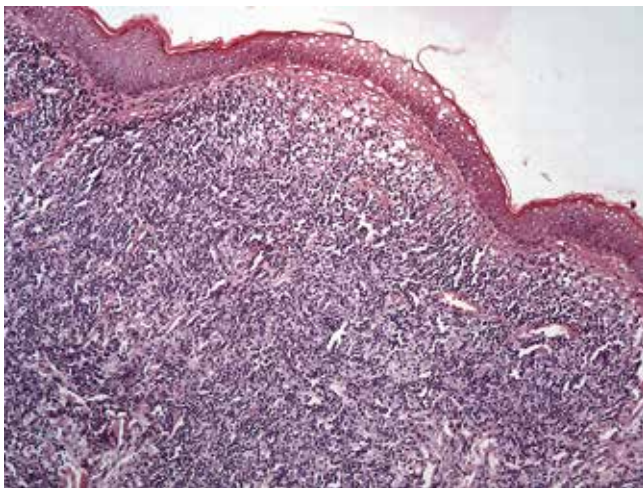


Рис. 2. Первичное кожное CD4<sup>+</sup> лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток. Окраска гематоксилином и эозином. ×100

Fig. 2. Primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative disorder. H&E stain. ×100

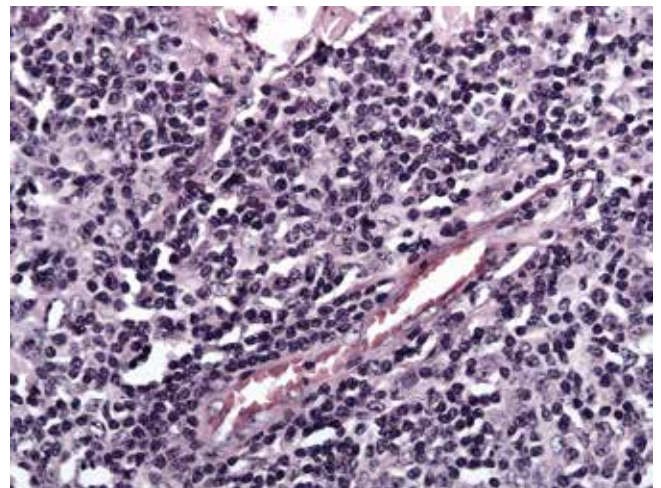


Рис. 3. Первичное кожное CD4<sup>+</sup> лимфопролиферативное заболевание из мелких и средних клеток. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Fig. 3. Primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoproliferative disorder. H&E stain. ×400

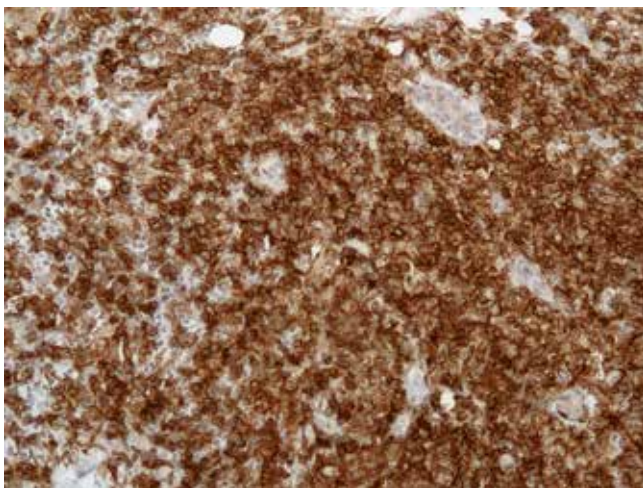


Рис. 4. Экспрессия CD4 клетками лимфоидного инфильтрата. Иммуногистохимический метод. ×200

Fig. 4. CD4 antibody assay. Immunohistochemical assay. ×200

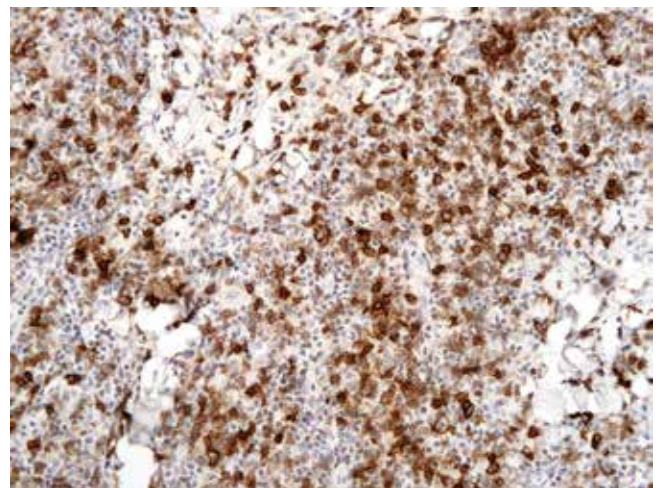


Рис. 5. Экспрессия ICOS клетками лимфоидного инфильтрата. Иммуногистохимический метод. ×200

Fig. 5. ICOS antibody assay. Immunohistochemical assay. ×200

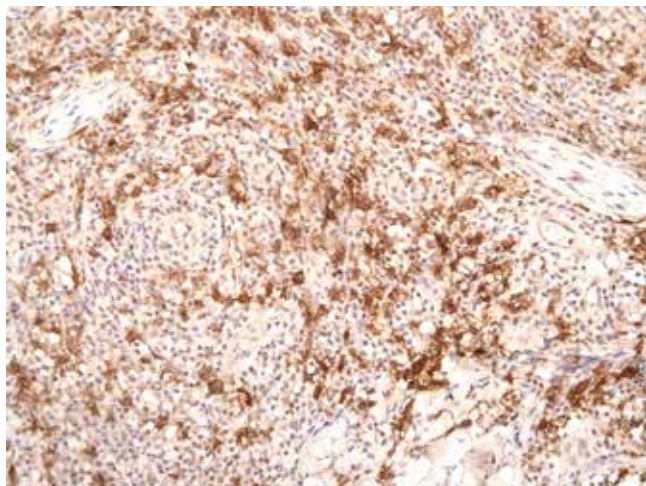


Рис. 6. Экспрессия PD-1 клетками лимфоидного инфильтрата. Иммуногистохимический метод.  $\times 200$

Fig. 6. PD-1 antibody assay. Immunohistochemical assay.  $\times 200$

позитивных клеток лимфоидного инфильтрата. PD-1-позитивные клетки располагались преимущественно разрозненно и формировали небольшие и крупные рыхлые скопления, в том числе периваскулярно. Вокруг крупных В-клеток PD-1-позитивные клетки формировали розеткоподобные структуры. Только в шести случаях (21,4%) отмечались скопления PD-1-позитивных клеток в гиподерме.

Исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие клональной реаранжировки генов  $\gamma$ -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) проведено 11 пациентам, из них у четырех (36,3%) обнаружена моноклональная Т-клеточная популяция.

## Обсуждение

Первичные кожные Т-клеточные лимфомы представляют собой гетерогенную группу лимфопролиферативных заболеваний, характеризующуюся клональной пролиферацией Т-лимфоцитов. При этом кожные морфологические элементы постепенно эволюционируют от пятен или бляшек до опухолевых узлов с признаками изъязвления. Стандартом диагностики периферических Т-клеточных лимфом является морфологическое исследование биоптата кожи.

В настоящее время с учетом накопления знаний об этиологии и механизмах развития лимфопролиферативных заболеваний кожи становится актуальной задача дифференциальной диагностики между кожными псевдолимфомами и ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток, а также пересмотра диагностических критериев лимфом кожи в классификации ВОЗ 2017 года.

Гистологическая картина ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток характеризуется наличием узла или группы узлов, расположенных в дерме и подкожной клетчатке, в то время как эпидермис в начальном периоде не поражен. Большое количество эозинофильных гранулоцитов и клеток реактивного микроокружения может затруднять диагностику данного заболевания [6].

С точки зрения патогенеза и диагностики ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток принципиальное значение имеет определение популяции Tfh-клеток. Полуколичественная оценка Tfh-позитивных клеток не может быть основой для диагноза, так как Tfh-позитивные клетки встречаются также при кожной лимфоидной гиперплазии. Важной для дифференциальной диагностики является иммуногистоархитектоника – кластеризация, полиморфизм размеров PD-1+ и ICOS-позитивных клеток и их периваскулярное расположение. В данной работе при исследовании биоптатов кожи с учетом накопленного нами опыта были использованы два наиболее информативных маркера Tfh-дифференцировки (ICOS, PD-1) из пяти возможных Tfh-маркеров (ICOS, PD-1, BCL-6, CD10, CXCL13) для иммуногистохимического исследования, применяемых при диагностике нодальных Т-клеточных лимфом с Tfh-иммунофенотипом. Так, по нашему опыту, экспрессия CD10 и BCL-6 в биоптатах кожи практически не определяется, а количество CXCL13-позитивных клеток крайне незначительно. Кроме того, CXCL-13-позитивные клетки в небольшом количестве могут встречаться и при кожных псевдолимфомах.

Следует подчеркнуть, что развитие фолликулярных Т-хелперов происходит из наивных CD4+ клеток и имеет несколько этапов дифференцировки. На первых этапах под воздействием цитокинов TGF- $\beta$ , Activin A и интерлейкинов IL-12, IL-23, IL-2 наивные CD4+ клетки созревают в CXCR5+ клетки-предшественницы Tfh-клеток. Клетки-предшественницы Tfh-клеток, в свою очередь, перемещаются в герминативные центры лимфоидных фолликулов, где дифференцируются в зрелые Tfh-клетки. Ключевым транскрипционным фактором является BCL-6, определяющая линию дифференцировки, свойства, функции, цитокиновый и хемокиновый профиль Tfh-клеток [7].

При антигенном воздействии клетки Лангерганса кожи обуславливают экспансию Tfh-клеток за счет миграции. Вместе с тем под влиянием клеток Лангерганса происходят активация В-клеток и увеличение их количества. Совместное взаимодействие Tfh-клеток и активированных В-клеток приводит к развитию гуморального ответа [8] и формированию морфологического субстрата заболевания – лимфоидного инфильтрата из Tfh-клеток и В-клеток.

Наиболее часто дифференциальную диагностику проводят с локальными формами грибовидного микоза (ГМ) и первичного рака кожи, В- или Т-клеточной псевдолимфомой, вторичным поражением кожи при нодальных Tfh-лимфомах [2, 9]. Значимость дифференциальной диагностики ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток со вторичным поражением кожи при нодальных Т-клеточных лимфомах с Tfh-иммунофенотипом обусловлена различием в течении и прогнозе заболевания. При проведении дифференциальной диагностики между ГМ и ПК CD4+ Т-ЛПЗ

из мелких/средних клеток кроме сходной морфологической картины в части случаев при ГМ в опухолевых клетках может также отмечаться коэкспрессия Tfh-маркеров [10–12]. Возможно, появление Tfh-иммунофенотипа в клетках лимфоидного инфильтрата при ГМ связано с эволюцией заболевания. При эволюции ГМ происходит постепенное замещение Т-хелперов 1-го типа на Т-хелперы 2-го типа с возрастанием экспрессии опухолевыми клетками транскрипционного фактора GATA3, являющегося конкурентным по отношению к транскрипционному фактору BCL6, что может быть причиной трансдифференцировки Т-хелперов 2-го типа в Tfh-клетки [13].

Макроскопическое и микроскопическое сходство ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток и кожных лимфоидных гиперплазий/кожных псевдолимфом вызывает значительные сложности в дифференциальной диагностике и требует проведения таких дополнительных методов как иммуногистохимическое исследование и полимеразная цепная реакция. Сопоставление иммуногистоархитектоники и результатов исследования методом ПЦР на наличие реаранжировки генов цепей TCR позволяет дифференцировать перечисленные выше нозологии [14, 15]. Наличие увеличенного количества клеток среднего и крупного размера (до 30%), большого числа клеток, обладающих Tfh-иммунофенотипом, и Т-клеточной клональности свидетельствует в пользу ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток [16].

Оптимальная стратегия терапии данного Т-клеточного лимфопролиферативного заболевания до сих пор не разработана. Для локальных форм могут быть применены хирургическая резекция, локальная лучевая терапия или воздействие на кожу длинноволнового ультрафиолетового излучения А в комбинации с ПУВА-терапией [17].

Редкие случаи первичных CD4+ лимфопролиферативных заболеваний с генерализованными поражениями кожи и быстрорастущими опухолями большого размера, демонстрирующими больше 30% крупных плеоморфных Т-клеток и/или высокую пролиферативную активность, не относятся к группе ПК CD4+ Т-ЛПЗ из мелких/средних клеток. Такие случаи обычно имеют более агрессивное клиническое течение и должны быть классифицированы как периферическая CD4+ Т-клеточная лимфома, без дополнительных уточнений [1].

## Заключение

Проведенное исследование позволило изучить и обобщить клинические (солитарный или множественные очаги, локализация высыпаний, индолентное течение), морфологические и иммуногистохимические признаки первичного кожного Т-клеточного лимфо-пролиферативного заболевания из мелких и средних клеток. При расширенном иммуногистохимическом исследовании изучены иммуногистоархитектоника и экс-

прессия Tfh-маркеров (PD-1, ICOS) клетками лимфоидного инфильтрата; среди реактивного микроокружения впервые исследована выраженность В-клеточной популяции.

Таким образом, иммуногистохимический метод исследований в диагностике заболеваний кожи – одно из наиболее значимых и развивающихся направлений в рамках комплексного обследования пациентов при новообразованиях кожи. Накопление клинических данных с установленным диагнозом «первичное кожное CD4+ лимфо-пролиферативное заболевание из мелких/средних клеток» позволит совершенствовать терапевтическую тактику ведения таких пациентов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Шерстнев, А.М. Ковригина.

Сбор и обработка материала – А.А. Шерстнев, А.М. Ковригина, Л.Г. Горенкова.

Написание текста – А.А. Шерстнев.

Редактирование – А.А. Шерстнев, А.М. Ковригина, Л.Г. Горенкова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – А.А. Sherstnev, А.М. Kovrigina.

Collected the data and performed the analysis – А.А. Sherstnev, А.М. Kovrigina, L.G. Gorenkova.

Wrote the paper – А.А. Sherstnev.

Edited the manuscript – А.А. Sherstnev, А.М. Kovrigina, L.G. Gorenkova.

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

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

## Литература/References

1. SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein et al (eds.). WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2017. P. 401–2.
2. Salah E. Primary cutaneous CD4+ small/medium pleomorphic T-cell lymphoproliferative disorder: Where do we stand? A systematic review. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2019;17(2):123–36. DOI: 10.1111/ddg.13691.
3. Willemze R, Beljaards RC, Meijer CJ, Rijlaarsdam JR. Classification of primary cutaneous T-cell lymphomas. *Histopathology.* 1994;24(5):405–15. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1994.tb00549.x.
4. Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: A proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood.* 1997;90(1):354–71. PMID: 9207472.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375–90. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.
6. Alberti-Violetti S, Torres-Cabala CA, Talpur R, Corti L, Fano-ni D, Venegoni L et al. Clinicopathological and molecular study of primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomor-

- phic T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol.* 2016;43(12):1121–30. DOI: 10.1111/cup.12806.
7. Yoshitomi H, Ueno H. Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):523–7. DOI: 10.1038/s41423-020-00529-z.
  8. Yao C, Zurawski SM, Jarrett ES, Chicoine B, Crabtree J, Peterson EJ et al. Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(5):1387–97.e1–7. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.04.001.
  9. Смольяникова В.А., Карамова А.Э., Воронцова А.А., Знаменская Л.Ф., Нefeldова М.А., Аулова К.М. Трудности дифференциальной диагностики грибвидного микоза и псориаза: клинико-морфологические сопоставления. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(3):73–80. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.73-80.  
*Smolyannikova VA, Karamova AE, Vorontsova AA, Znamenskaya LF, Nefeldova MA, Aulova KM.* Problems in differential diagnosis of mycosis fungoides and psoriasis: comparison of clinical and morphological features. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(3):73–80 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.73-80.
  10. Shi HZ, Zhang J, Xiong JS, Gan L, Jiang YQ, Xu XL et al. Clinicopathological analysis of primary cutaneous CD4-positive small/medium pleomorphic T-cell lymphoproliferative disorder: A retrospective study of 22 patients. *Int J Dermatol.* 2021;60(4):497–502. DOI: 10.1111/ijd.15372.
  11. Meyerson HJ, Awadallah A, Pavlidakey P, Cooper K, Honda K, Miedler J. Follicular center helper T-cell (TFH) marker positive mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Mod Pathol.* 2013;26(1):32–43. DOI: 10.1038/modpathol.2012.124.
  12. Cerroni L. Mycosis fungoides-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* 2018;37(1):2–10. DOI: 10.12788/j.sder.2018.002.
  13. Amador C, Greiner TC, Heavican TB, Smith LM, Galvis KT, Lone W et al. Reproducing the molecular subclassification of peripheral T-cell lymphoma-NOS by immunohistochemistry. *Blood.* 2019;134(24):2159–70. DOI: 10.1182/blood.2019000779.
  14. Ardeleanu V, Moroianu LA, Sava A, Tebeica T, Jecan RC, Moroianu M et al. Surgical, dermatological and morphopathological considerations in the diagnosis and treatment of cutaneous lymphoproliferative tumors, primary CD4. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(11):1618. DOI: 10.3390/medicina58111618.
  15. Beltraminelli H, Leinweber B, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous CD4+ small-/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: A cutaneous nodular proliferation of pleomorphic T lymphocytes of undetermined significance? A study of 136 cases. *Am J Dermatopathol.* 2009;31(4):317–22. DOI: 10.1097/DAD.0b013e31819f19bb.
  16. Beltzung F, Ortonne N, Pelletier L, Beylot-Barry M, Ingen-Housz-Oro S, Franck F et al. Primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoproliferative disorders: A clinical, pathologic, and molecular study of 60 cases presenting with a single lesion: A multicenter study of the French Cutaneous Lymphoma Study Group. *Am J Surg Pathol.* 2020;44(7):862–72. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001470.
  17. Surmanowicz P, Doherty S, Sivanand A, Parvinnejad N, Deschenes J, Schneider M et al. The clinical spectrum of primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoproliferative disorder: An updated systematic literature review and case series. *Dermatology.* 2021;237(4):618–28. DOI: 10.1159/000511473.

### Информация об авторах

Андрей Алексеевич Шерстнев – аспирант патологоанатомического отделения, врач-патологоанатом Национального медицинского центра гематологии.

Алла Михайловна Ковригина – доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением Национального медицинского центра гематологии.

Лилия Гамилевна Горенкова – кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения химиотерапии лимфатических опухолей с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток с дневным стационаром Национального медицинского центра гематологии.

### Author information

Andrei A. Sherstnev – Postgraduate Student of the Pathology Department, Pathologist, National Research Center for Hematology. <https://orcid.org/0000-0002-1597-4591>

Alla M. Kovrigina – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Pathology Department, National Research Center for Hematology. <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>

Liliya G. Gorenkova – Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of Chemotherapy of Lymphatic Tumors and Unit of Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cell Transplantation, National Research Center for Hematology. <https://orcid.org/0000-0002-3967-9183>

## Влияние преждевременного рождения на васкуляризацию миокарда левого желудочка крыс в постнатальном периоде онтогенеза

*В.В. Иванова<sup>1</sup>, О.Н. Серебрякова<sup>1</sup>, А.В. Калиновский<sup>1</sup>, И.В. Суходоло<sup>1</sup>, И.В. Мильто<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Северский биофизический научный центр ФМБА России, Северск, Россия

**Резюме.** *Введение.* Преждевременное рождение нарушает важные процессы роста и развития плода и может служить триггером дезадаптивного ремоделирования органов в постнатальном периоде онтогенеза. Целью данного исследования является оценка влияния преждевременного рождения на ангиогенез миокарда левого желудочка крыс с 1-х по 21-е сутки постнатального периода онтогенеза.

*Материалы и методы.* Проведена иммуногистохимическая (CD31) и морфометрическая (удельный объем кровеносных капилляров, удельный объем кардиомиоцитов, диаметр кровеносных капилляров, трофический индекс, зона перикапиллярной диффузии) оценка миокарда левого желудочка сердца доношенных и преждевременно родившихся (на 12 часов и на 24 часа ранее срока) крыс линии Вистар обоего пола (n=88) на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки постнатального периода онтогенеза.

*Результаты.* При рождении крыс на 12 часов и на 24 часа ранее срока не выявлены изменения показателей, характеризующих темпы васкуляризации миокарда левого желудочка: удельного объема кровеносных капилляров и трофического индекса в миокарде левого желудочка на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки постнатального периода онтогенеза. На 7–21-е сутки постнатального периода онтогенеза по сравнению с показателями животных, родившихся в срок, отмечено снижение удельного объема кардиомиоцитов миокарда левого желудочка. Показано снижение диаметра кровеносных капилляров миокарда левого желудочка у самок крыс на 21-е сутки постнатального периода онтогенеза. Рождение крыс на 24 часа ранее срока сопровождается увеличением зоны перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка крыс на 14-е сутки постнатального периода онтогенеза в сравнении с таковым животных, родившихся в срок.

*Заключение.* Выраженность наблюдаемых изменений в миокарде левого желудочка крыс тем больше, чем меньше продолжительность внутриутробного периода их развития. Перспективным представляется исследование функционального состояния эндотелиоцитов кровеносных сосудов миокарда преждевременно родившихся животных в постнатальном периоде.

**Ключевые слова:** преждевременное рождение, незрелость, миокард, ангиогенез, сосудистые индексы

**Для корреспонденции:** Вера Владимировна Иванова. E-mail: ivvera92@rambler.ru

**Для цитирования:** Иванова В.В., Серебрякова О.Н., Калиновский А.В., Суходоло И.В., Мильто И.В. Влияние преждевременного рождения на васкуляризацию миокарда левого желудочка крыс в постнатальном периоде онтогенеза. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):61–68. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.61-68.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Статья поступила 10.06.2022. Получена после рецензирования 06.09.2022. Принята в печать 15.09.2022.

## Influence of preterm birth on the vascularization of the left ventricular myocardium of rats in the postnatal ontogenesis

*V.V. Ivanova<sup>1</sup>, O.N. Serebryakova<sup>1</sup>, A.V. Kalinovskij<sup>1</sup>, I.V. Sukhodolo<sup>1</sup>, I.V. Milto<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Preterm birth disrupts important processes of fetal growth and development and can serve as a trigger for maladaptive organ remodeling in the postnatal ontogenesis. The aim of the study was to evaluate the effect of preterm birth on the angiogenesis of the left ventricular myocardium of rats from days 1 to 21 of the postnatal ontogenesis.

*Materials and methods.* We performed immunohistochemical (CD31) and morphometric (specific volume of blood capillaries, specific volume of cardiomyocytes, diameter of blood capillaries, trophic index and pericapillary diffusion zone) study of the left ventricular myocardium of full-term and prematurely born (12 and 24 hours preterm) Wistar rats (n=88) of both sexes on days 1, 7, 14, and 21 of the postnatal ontogenesis.

*Results.* The birth of rats 12 and 24 hours preterm does not result in change in the specific volume of blood capillaries and the trophic index in the left ventricular myocardium on days 1, 7, 14, and 21 of the postnatal period. Preterm birth leads to a decrease in the specific volume of cardiomyocytes of the left ventricular myocardium of rats, compared to the parameters of animals in the control group, on days 7–21 of the postnatal period. Preterm birth results in a decrease in the diameter of the blood capillaries of the left ventricular myocardium in female rats on day 21 of the postnatal period. Preterm birth (24 hours preterm) is accompanied by an increase in the size of the zone of pericapillary diffusion in the left ventricular myocardium of rats on day 14 of the postnatal ontogenesis, in comparison with that of animals in the control group.

*Conclusion.* The shorter the duration of the intrauterine period of development of rats, the greater the severity of the observed changes in the left ventricular myocardium are. It seems promising to study the functional state of endotheliocytes of myocardial blood vessels in preterm animals in the postnatal period.

**Keywords:** preterm birth, prematurity, myocardium, angiogenesis, vascular indexes

**Corresponding author:** Vera V. Ivanova. E-mail: ivvera92@rambler.ru

**For citation:** Ivanova V.V., Serebryakova O.N., Kalinovskij A.V., Sukhodolo I.V., Milto I.V. Influence of preterm birth on the vascularization of the left ventricular myocardium of rats in the postnatal ontogenesis. Clin. exp. morphology. 2023;12(2):61–68 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.61-68.

**Funding.** The study was supported by the Strategic Academic Leadership Program “Priority-2030”.

**Received** 10.06.2022. **Received in revised form** 06.09.2022. **Accepted** 15.09.2022.

## Введение

Совершенство неонатального ухода способствует увеличению выживаемости недоношенных детей и росту доли преждевременно родившихся среди всех новорожденных [1]. Тем не менее в последние годы стало очевидным, что преждевременное рождение ассоциировано с риском раннего развития заболеваний сердца [2–4].

Преждевременное рождение нарушает процессы роста и развития плода и может служить триггером дезадаптивного ремоделирования органов в постнатальном периоде онтогенеза. Согласно одной из гипотез, преждевременное рождение оказывает влияние на ангиогенез в постнатальном периоде онтогенеза (ППО). Показано, что в пуповинной крови у преждевременно родившихся детей концентрация проангиогенных факторов (фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-1, тромбоцитарный фактор роста АА, фактор роста фибробластов а и фактор роста фибробластов б) ниже, чем у доношенных, тогда как концентрация антиангиогенных факторов (эндостатин и тромбоспондин-2) повышена [5, 6]. Уже на 2–3-м месяце постнатального периода онтогенеза определяется увеличение извитости артерий сетчатой оболочки глаза у преждевременно родившихся детей в сравнении с доношенными сверстниками [7]. Вместе с тем влияние преждевременного рождения на развитие кровеносных сосудов миокарда в ППО не изучено. Единичные исследования, направленные на изучение васкуляризации миокарда преждевременно родившихся детей, малоинформативны, так как в качестве

сравнения использовали сердца мертворожденных детей [8]. Таким образом, актуально проведение экспериментальных исследований. Целью данной работы является оценка влияния преждевременного рождения на ангиогенез миокарда левого желудочка крыс с 1-х по 21-е сутки ППО.

## Материалы и методы

Исследование осуществлено в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, а также требованиями совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протокол эксперимента одобрен решением локального этического комитета СибГМУ № 8475/1 от 30.11.2020.

Эксперимент проведен на доношенных и преждевременно родившихся крысах линии Вистар обоего пола. Потомство получено от интактных самцов (2 месяца, 180±20 граммов) и самок (3 месяца, 180±20 граммов) крыс линии Вистар. Подробное описание получения потомства, индукции преждевременных родов приведено ранее [9].

Полная продолжительность беременности крыс линии Вистар составляет 22 суток [10, 11]. Потомство крыс, родившихся в срок, составило контрольную группу (n=24). Выраженность морфофункциональных особенностей сердца коррелирует со степенью недоношенности [12], поэтому в исследовании выделены две группы крыс, рожденных на 21,5 и 21-е сутки беременности. Крысы, родившиеся ранее 21 суток гестации, нежизнеспособны. Для индукции преждевременных

родов на 21-е или 21,5 сутки беременности мифепристон (1 мл, 10 мг/кг массы тела, Sigma-Aldrich, США) вводили крысам на 20-е или 20,5 сутки беременности, соответственно [13]. Потомство, родившееся на 21,5 сутки беременности, составило 1-ю группу (n=32). Потомство, родившееся на 21-е сутки беременности, составило 2-ю группу (n=32). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме. Новорожденных крыс взвешивали на лабораторных весах (HL-100, Япония). Потомство выводили из эксперимента асфиксией углекислым газом на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки ППО. Сердце фиксировали в 10% водном растворе формалина (pH 7,4) в течение 24 часов для иммуногистохимического исследования.

После фиксации получали серийные поперечные срезы средней трети желудочков сердца на уровне сопочковых мышц сердца (толщиной 5 мкм) по рутинной гистологической методике [14]. После депарафинирования и регидратации срезов осуществляли высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0,01M, pH 6,0) (Abcam, Великобритания). Для минимизации неспецифического иммунного окрашивания ингибировали эндогенную пероксидазную активность и проводили протеиновый блок. Срезы инкубировали с первичными антителами 45 минут при температуре +25°C. В качестве первичных антител использовали моноклональные кроличьи Anti-CD31 [EPR17259], ab182981 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:500. Иммуногистохимическое выявление CD31 облегчает идентификацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда и их последующую морфометрию. Визуализацию иммуногистохимической реакции осуществляли системой детекции Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Abcam, Великобритания), срезы докрасивали гематоксилином Джилла («Бiovитрум», Россия).

Гистологические препараты изучали на световом микроскопе AxioScope 40 (Zeiss, Германия). Фотографии боковой стенки левого желудочка (не менее чем 5 полей зрения) получали с помощью цифровой камеры CanonG5 (Canon, Китай) и программного обеспечения AxioVision 4.8 (Zeiss, Германия). Сердце крыс в исследуемые сроки характеризуется малыми размерами, поэтому для получения 5 различных полей зрения боковой стенки левого желудочка анализировали серийные срезы сердца. Полученные фотографии использовали для определения удельного объема кровеносных капилляров, удельного объема кардиомиоцитов, а также диаметра кровеносных капилляров в программе ImageJ 1.48 (NIH, США). Удельные объемы определяли методом точечного счета [15]. При подсчете удельного объема капилляров учитывали не только точки, которые попадали на эндотелиоциты капилляров, но и точки, расположенные в их просвете. В каждом поле зрения измеряли диаметр не менее чем 5 кровеносных капилляров.

Трофический индекс миокарда левого желудочка рассчитывали как отношение удельного объема кровеносных капилляров миокарда к удельному объему кардиомиоцитов. Зона перикапиллярной диффузии представляет собой отношение диаметра кровеносных капилляров к их удельному объему.

Статистический анализ при помощи программы SPSS 16.0 (IBM, США) проведен с использованием критериев Шапиро–Уилка и Манна–Уитни. Результаты морфометрического исследования представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>), уровень статистической значимости различий принят p<0,05.

## Результаты

В контрольной группе масса тела новорожденных самцов крыс составила 6,01 грамма (5,71; 6,20), самок – 5,68 грамма (5,49; 5,88). В 1-й группе масса тела новорожденных самцов крыс составила 5,56 грамма (5,18; 5,83), самок крыс – 4,94 грамма (4,75; 4,98). Масса тела новорожденных самцов и самок 1-й группы была меньше, чем у животных контрольной группы (p=0,016 и p=0,021, соответственно). Во 2-й группе масса тела новорожденных самцов составила 4,32 грамма (4,21; 4,57), самок – 3,99 грамма (3,69; 4,31). Масса тела новорожденных самцов и самок 2-й группы была меньше, чем у крыс контрольной группы (p=0,001 и p=0,008, соответственно) и 1-й группы (p=0,028 и p=0,016, соответственно). Мы не обнаружили связанных с полом отличий массы тела новорожденных крыс контрольной, 1-й и 2-й групп.

В миокарде левого желудочка сердца крыс всех изучаемых групп CD31-позитивно окрашиваются эндотелиоциты кровеносных сосудов (рис. 1). С 1-х по 21-е сутки ППО в миокарде крыс формируется обширная сосудистая сеть. Кровеносные капилляры расположены в соединительной ткани миокарда (рис. 2).

Удельный объем кровеносных капилляров миокарда левого желудочка крыс контрольной, 1-й и 2-й групп отражен в таблице 1. Не обнаружено связанных с полом отличий данного показателя левого желудочка животных контрольной, 1-й и 2-й групп. Преждевременное рождение крыс на 12 часов и на 24 часа не приводит к уменьшению удельного объема кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки ППО.

Удельный объем кардиомиоцитов в левом желудочке крыс контрольной группы в исследуемые сроки был стабильным, тогда как у крыс 1-й и 2-й групп данный показатель на протяжении эксперимента снижался (табл. 1). Показано, что удельный объем кардиомиоцитов в левом желудочке у самок 1-й и 2-й групп превышал аналогичный показатель самцов на 14-е сутки ППО. Удельный объем кардиомиоцитов левого желудочка преждевременно родившихся крыс был ниже аналогичного показателя животных контрольной группы на 7-е, 14-е и 21-е сутки ППО (табл. 1).

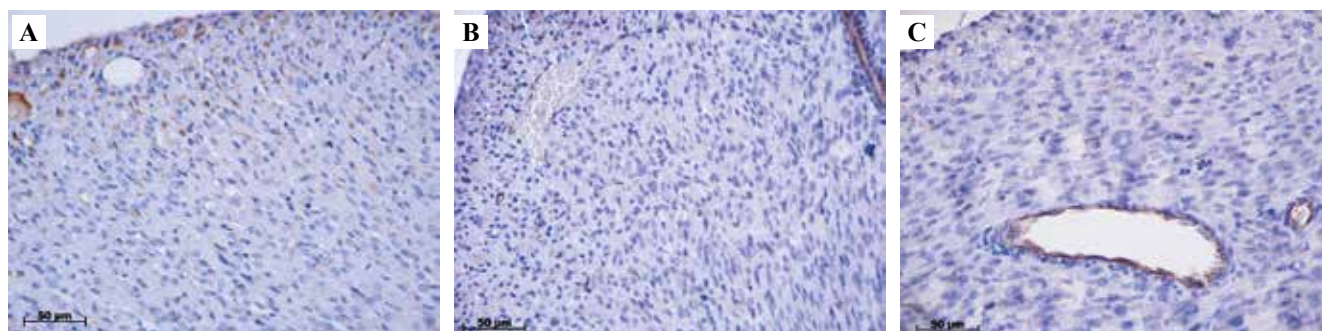


Рис. 1. Миокард левого желудочка самок крыс контрольной (А), 1-й (В) и 2-й (С) групп, 7-е сутки постнатального периода онтогенеза. ИГХ окрашивание к CD31, докраска гематоксилином Джилла,  $\times 400$

Fig. 1. Left ventricular myocardium of female rats of the control group (A), group 1 (B), and group 2 (C) on day 7 of postnatal development. IHC assay with CD31, additional staining with Gill's hematoxylin,  $\times 400$

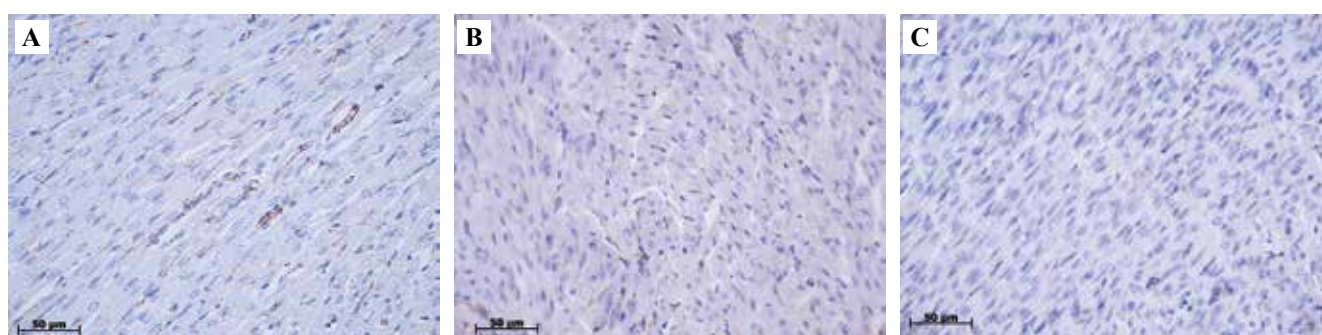


Рис. 2. Миокард левого желудочка самцов крыс контрольной (А), 1-й (В) и 2-й (С) групп, 21-е сутки постнатального периода онтогенеза. ИГХ окрашивание к CD31, докраска гематоксилином Джилла,  $\times 400$

Fig. 2. Left ventricular myocardium of male rats of the control group (A), group 1 (B), and group 2 (C) on day 21 of postnatal development. IHC assay with CD31, additional staining with Gill's hematoxylin,  $\times 400$

Таблица 1 | Table 1

**Морфометрические показатели миокарда левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс |  
Left ventricular myocardium parameters in preterm and full-term rats**

Группа   Group	Постнатальный период онтогенеза, сутки   Postnatal days							
	1-е		7-е		14-е		21-е	
Пол   Sex	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females
<b>Удельный объем кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс, усл. ед., Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)   Blood capillaries specific volume of the left ventricular myocardium of preterm and full-term rats, arb. units, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</b>								
контрольная группа   control group	19,0 (17,0; 24,0)	23,0 (19,5; 27,0)	25,0 (22,0; 29,0)	24,0 (21,0; 30,0)	23,0 (20,0; 25,0)	21,0 (20,5; 25,0)	21,0 (20,0; 26,0)	20,0 (18,0; 25,0)
1-я группа   group 1	20,0 (18,5; 22,5)	20,0 (17,5; 22,5)	23,0 (20,0; 26,5)	26,0 (22,0; 26,5)	23,0 (20,5; 26,5)	21,0 (19,0; 25,5)	23,0 (20,5; 25,5)	21,0 (18,5; 23,5)
2-я группа   group 2	22,0 (18,5; 24,5)	21,0 (20,0; 23,5)	21,0 (15,5; 24,5)	20,0 (16,5; 24,5)	19,0 (17,0; 22,5)	20,0 (16,5; 23,0)	21,0 (18,0; 21,0)	21,0 (18,0; 22,5)
<b>Удельный объем кардиомиоцитов в миокарде левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс, усл. ед., Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)   Cardiomyocytes specific volume of the left ventricular myocardium of preterm and full-term rats, arb. units, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</b>								
контрольная группа   control group	79,0 (75,0; 81,0)	74,0 (71,5; 79,5)	71,0 (69,5; 74,0)	73,0 (68,5; 76,0)	71,0 (68,0; 74,5)	69,0 (69,0; 73,5)	71,0 (67,0; 74,0)	72,0 (72,0; 76,0)



Окончание таблицы 1 | Table 1 (ended)

Группа   Group	Постнатальный период онтогенеза, сутки   Postnatal days							
	1-е		7-е		14-е		21-е	
Пол   Sex	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females
1-я группа   group 1	79,0 (76,5; 80,0)	78,0 (76,5; 81,5)	72,0 (70,5; 74,0)	71,0 (69,5; 72,5)	63,0 (62,5; 65,5)	65,0 (64,5; 67,0)	59,0 (55,5; 62,0)	63,0 (61,5; 64,5)
					p <sub>1</sub> =0,042 p <sub>2</sub> =0,008	p=0,034 p <sub>1</sub> =0,043 p <sub>2</sub> =0,008	p <sub>1</sub> =0,043 p <sub>2</sub> =0,008	p <sub>2</sub> =0,008
2-я группа   group 2	76,0 (74,0; 80,5)	77,0 (75,0; 79,0)	65,0 (63,0; 67,5)	65,0 (64,5; 68,5)	65,0 (58,0; 66,0)	69,0 (65,5; 72,0)	60,0 (59,0; 67,0)	63,0 (58,0; 63,5)
			p <sub>1</sub> =0,042 p <sub>2</sub> =0,008 p <sub>3</sub> =0,008	p <sub>3</sub> =0,016	p <sub>2</sub> =0,008	p=0,043	p <sub>2</sub> =0,032	p <sub>2</sub> =0,008
<b>Диаметр кровеносных капилляров миокарда левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс, мкм, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)   Diameter of blood capillaries of the left ventricular myocardium of preterm and full-term rats, μm, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</b>								
контрольная группа   control group	3,6 (2,5; 4,3)	5,6 (3,5; 6,5)	3,7 (3,2; 3,9)	3,6 (3,0; 3,8)	3,2 (2,6; 4,0)	3,0 (2,3; 3,2)	3,2 (2,7; 3,6)	3,2 (2,8; 3,5)
						p <sub>1</sub> =0,032		
1-я группа   group 1	4,0 (3,3; 5,8)	4,4 (3,6; 4,9)	3,5 (3,0; 3,6)	3,3 (2,9; 4,1)	2,9 (2,0; 3,6)	2,7 (2,3; 3,3)	2,9 (2,4; 3,5)	2,3 (1,7; 2,7)
			p <sub>1</sub> =0,021					
2-я группа   group 2	4,1 (3,5; 5,4)	4,5 (2,4; 5,6)	3,4 (2,9; 3,9)	3,0 (2,9; 3,6)	3,9 (3,0; 4,4)	3,7 (3,0; 4,1)	2,6 (1,7; 3,2)	2,8 (1,9; 3,0)
						p <sub>2</sub> =0,043 p <sub>3</sub> =0,023		p <sub>1</sub> =0,008

p – отличие от показателя самцов крыс; p<sub>1</sub> – отличие от показателя на предыдущий срок; p<sub>2</sub> – отличие от показателя крыс контрольной группы; p<sub>3</sub> – отличие от показателя у крыс 1-й группы

Differences are significant in comparison with the following: the indicator of male rats (p), the previous period indicator (p<sub>1</sub>), the indicator of the control group (p<sub>2</sub>), the indicator of group 1 (p<sub>3</sub>)

Снижение удельного объема кардиомиоцитов в левом желудочке крыс 2-й группы определялось раньше, чем у крыс 1-й группы (табл. 1).

Нами не обнаружено полового диморфизма трофического индекса в миокарде левого желудочка у потомства контрольной, 1-й и 2-й групп. Трофический индекс в миокарде левого желудочка не изменяется с 1-х по 21-е сутки ППО у крыс всех экспериментальных групп. Преждевременное рождение крыс на 12 часов и на 24 часа не приводит к изменению данного показателя миокарда левого желудочка на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки ППО (табл. 2).

Не обнаружено связанных с полом отличий диаметра кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка крыс контрольной, 1-й и 2-й групп.

В ходе ППО определялась тенденция к снижению диаметра кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка крыс контрольной, 1-й и 2-й групп (табл. 1). Диаметр кровеносных капилляров левого желудочка самок 2-й группы превышал аналогичный показатель самок контрольной и 1-й групп на 14-е сутки ППО. У самок 1-й и 2-й групп диаметр кровеносных капилляров миокарда левого желудочка был снижен по сравнению с аналогичным показателем у самок контрольной группы на 21-е сутки ППО (табл. 1).

Зона перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка являлась стабильным показателем у крыс контрольной и 1-й групп, тогда как у самцов 2-й группы исследуемый показатель снижался на 21-е сутки ППО.

Сосудистые индексы миокарда левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс |  
Left ventricular myocardium vascular indexes in preterm and full-term rats

Группа   Group	Постнатальный период онтогенеза, сутки   Postnatal days							
	1-е		7-е		14-е		21-е	
Пол   Sex	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females	самцы   males	самки   females
<b>Трофический индекс в миокарде левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс, усл. ед., Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)   Trophic index of the left ventricular myocardium of preterm and full-term rats, arb. units, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</b>								
контрольная группа   control group	0,24 (0,21; 0,32)	0,31 (0,25; 0,38)	0,35 (0,30; 0,42)	0,33 (0,28; 0,45)	0,34 (0,27; 0,36)	0,30 (0,28; 0,36)	0,29 (0,28; 0,38)	0,28 (0,24; 0,35)
1-я группа   group 1	0,25 (0,23; 0,30)	0,26 (0,22; 0,30)	0,32 (0,27; 0,38)	0,37 (0,31; 0,38)	0,37 (0,31; 0,42)	0,31 (0,29; 0,40)	0,37 (0,35; 0,46)	0,32 (0,30; 0,38)
2-я группа   group 2	0,29 (0,23; 0,33)	0,27 (0,26; 0,32)	0,33 (0,24; 0,37)	0,31 (0,26; 0,36)	0,30 (0,29; 0,34)	0,27 (0,24; 0,34)	0,35 (0,27; 0,36)	0,35 (0,29; 0,38)
<b>Зона перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка преждевременно родившихся и доношенных крыс, мкм, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)   Pericapillar diffusion zone of the left ventricular myocardium of preterm and full-term rats, μm, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</b>								
контрольная группа   control group	0,16 (0,16; 0,23)	0,16 (0,16; 0,26)	0,14 (0,13; 0,18)	0,14 (0,13; 0,15)	0,13 (0,11; 0,22)	0,11 (0,11; 0,13)	0,16 (0,13; 0,16)	0,15 (0,14; 0,16)
1-я группа   group 1	0,19 (0,18; 0,25)	0,23 (0,21; 0,23)	0,14 (0,14; 0,15) b	0,13 (0,13; 0,17)	0,13 (0,12; 0,14)	0,12 (0,12; 0,14)	0,13 (0,13; 0,14)	0,11 (0,09; 0,12) p=0,042 p <sub>2</sub> =0,008
2-я группа   group 2	0,19 (0,17; 0,24)	0,24 (0,12; 0,26)	0,15 (0,14; 0,21)	0,16 (0,15; 0,18)	0,18 (0,18; 0,21) p <sub>3</sub> =0,008	0,17 (0,14; 0,18) p <sub>2</sub> =0,016 p <sub>3</sub> =0,016	0,12 (0,07; 0,17) p <sub>1</sub> =0,043	0,14 (0,12; 0,15)

p – отличие от показателя самцов крыс; p<sub>1</sub> – отличие от показателя на предыдущий срок; p<sub>2</sub> – отличие от показателя крыс контрольной группы; p<sub>3</sub> – отличие от показателя у крыс 1-й группы  
Differences are significant in comparison with the following: the indicator of male rats (p), the previous period indicator (p<sub>1</sub>), the indicator of the control group (p<sub>2</sub>), the indicator of group 1 (p<sub>3</sub>)

Установлено, что показатель зоны перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка самок крыс 1-й группы меньше аналогичного показателя самцов этой же группы на 15%, а также самок контрольной группы на 26% на 21-е сутки ППО. Данный показатель у самок крыс 2-й группы на 54% больше такового у самок контрольной группы на 14-е сутки ППО. Показатель зоны перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка самцов и самок крыс 2-й группы был выше аналогичного показателя крыс 1-й группы на 38% и 30%, соответственно, на 14-е сутки ППО (табл. 2).

### Обсуждение

Масса тела преждевременно родившихся крыс на 1-е сутки ППО меньше, чем у доношенных сверстников, что подтверждает факт получения недоношенного потомства в ходе эксперимента.

Известно, что на 20–21-е сутки беременности у плодов крыс артерии и вены сердца сформированы и расположены так же, как у половозрелых животных [16], тогда как формирование кровеносных капилляров миокарда протекает вплоть до рождения и активно продолжается в постнатальном периоде, сопровождая рост сердца [17, 18].

Мы показали, что у преждевременно родившихся крыс так же, как у доношенных животных, в постнатальном периоде кровеносные капилляры сердца развиваются в направлении от эпикарда в миокард, и наши результаты согласуются с результатами других исследователей [19]. По нашим данным, преждевременное рождение крыс на 12 часов или на 24 часа ранее срока не приводит к изменениям удельного объема кровеносных капилляров и трофического индекса в миокарде левого желудочка с 1-х по 21-е сутки ППО. Таким образом, преждевременное рождение не замедляет темпы

васкуляризации миокарда левого желудочка с 1-х по 21-е сутки ППО.

Диаметр кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка крыс в первую неделю ППО значительно уменьшается, достигая значений, характерных для половозрелых животных [18]. Согласно полученным нами результатам, преждевременное рождение приводит к более позднему и более выраженному уменьшению диаметра кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка в сравнении с таковым у доношенных сверстников. Таким образом, преждевременное рождение влечет за собой замедление созревания кровеносных капилляров миокарда левого желудочка.

Нами показано, что преждевременное рождение характеризуется уменьшением удельного объема кардиомиоцитов, которое, в свою очередь, может быть причиной относительного увеличения трофического индекса в миокарде левого желудочка. Примечательно, что снижение удельного объема кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс определяется тем раньше, чем больше степень недоношенности. Наблюдаемое нами на 14-е сутки ППО увеличение зоны перикапиллярной диффузии в миокарде свидетельствует о преходящем ухудшении трофики миокарда левого желудочка крыс, родившихся на 24 часа ранее срока.

Стоит отметить, что в нашем исследовании отсутствовали связанные с полом отличия диаметра кровеносных капилляров, удельных объемов кровеносных капилляров и кардиомиоцитов, трофического индекса и зоны перикапиллярной диффузии в миокарде левого желудочка крыс контрольной группы с 1-х по 21-е сутки ППО. В настоящей работе показано, что преждевременное рождение сопровождалось более выраженным снижением удельного объема кардиомиоцитов левого желудочка самцов крыс, нежели самок. Наблюдаемые связанные с полом различия нивелируются уже к 21-м суткам ППО.

## Заключение

Преждевременное рождение не влияет на темпы васкуляризации миокарда левого желудочка с 1-х по 21-е сутки постнатального периода онтогенеза, однако замедляет становление диаметра кровеносных капилляров, что сопровождается преходящим ухудшением трофики миокарда левого желудочка преждевременно родившихся животных. Наблюдаемые изменения тем больше выражены, чем короче продолжительность внутриутробного периода развития. Перспективным представляется исследование функционального состояния эндотелиоцитов кровеносных сосудов миокарда преждевременно родившихся животных в постнатальном периоде.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.В. Иванова, И.В. Мильто.  
Сбор и обработка материала – В.В. Иванова, А.В. Калиновский.  
Написание текста – В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова.  
Редактирование – И.В. Суходоло, И.В. Мильто.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.V. Ivanova, I.V. Milto.  
Collected the data and performed the analysis – V.V. Ivanova, A.V. Kalinovskij.  
Wrote the paper – V.V. Ivanova, O.N. Serebryakova.  
Edited the manuscript – I.V. Sukhodolo, I.V. Milto.

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

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

## Литература/References

1. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(2):74–9. DOI: 10.1016/j.siny.2015.12.007.
2. Carr H, Cnattingius S, Granath F, Ludvigsson JF, Edstedt Bonamy AK. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(21):2634–42. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.03.572.
3. Lewandowski AJ, Levy PT, Bates ML, McNamara PJ, Nuyt AM, Goss KN. Impact of the vulnerable preterm heart and circulation on adult cardiovascular disease risk. *Hypertension.* 2020;76(4):1028–37. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15574.
4. Goss KN, Haraldsdottir K, Beshish AG, Barton GP, Watson AM, Palta M. Association between preterm birth and arrested cardiac growth in adolescents and young adults. *JAMA Cardiol.* 2020;5(8):910–9. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1511.
5. Gródecka-Szwajkiewicz D, Ułańczyk Z, Zagrodnik E, Łuczowska K, Rogińska D, Kawa MP et al. Differential secretion of angiopoietic factors and expression of microRNA in umbilical cord blood from healthy appropriate-for-gestational-age preterm and term newborns-in search of biomarkers of angiogenesis-related processes in preterm birth. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1305. DOI: 10.3390/ijms21041305.
6. Puchwein-Schwepecke A, Artmann S, Rajwich L, Genzel-Boroviczeny O, Nussbaum C. Effect of gestational age and postnatal age on the endothelial glycocalyx in neonates. *Sci Rep.* 2021;11(1):3133. DOI: 10.1038/s41598-021-81847-8.
7. Minicucci G, Lepore D, Molle F. Abnormal retinal vascularisation in preterm children. *Lancet.* 1999;353(9158):1099–100. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)76457-6.
8. Bensley JG, Moore L, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Impact of preterm birth on the developing myocardium of the neonate. *Pediatr Res.* 2018;83(4):880–8. DOI: 10.1038/pr.2017.324.
9. Иванова В.В., Мильто И.В., Серебрякова О.Н., Суходоло И.В. Особенности структуры миокарда левого желудочка преждевременно рожденных крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. *Цитология.* 2022;64(2):141–149. DOI: 10.31857/S0041377122020031.  
Ivanova VV, Milto IV, Serebryakova ON, Sukhodolo IV. Structural features of left ventricle myocardium in premature born rats in the early postnatal ontogenesis. *Tsitologiya.* 2022;64(2):141–149 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377122020031.
10. Shynlova O, Kwong R, Lye SJ. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy.

- Reproduction. 2010;139(1):247–53. DOI: 10.1530/REP-09-0260.
11. Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2(1):26. DOI: 10.1186/1758-5996-2-26.
  12. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016;95(6):652–63. DOI: 10.1111/aogs.12880.
  13. Dudley DJ, Branch DW, Edwin SS, Mitchell MD. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol Reprod*. 1996;55(5):992–5. DOI: 10.1095/biolreprod55.5.992.
  14. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. 95 с. *Korzhevskii DE, Gilyarov AV. Basics of histological technique. Saint Petersburg: SpecLit, 2010. 95 p. (In Russ.)*.
  15. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. Москва: Медицина, 1990. 384 с. *Avtandilov GG. Medical morphometry: Guideline. Moscow: Meditsina, 1990. 384 p. (In Russ.)*.
  16. Ratajska A, Cizek B, Sowińska A. Embryonic development of coronary vasculature in rats: Corrosion casting studies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;270(2):109–16. DOI: 10.1002/ar.a.10011.
  17. GA Parker, CA Picut (eds.). Atlas of histology of the juvenile rat. 1st ed. New York: Academic Press, 2016. 462 p.
  18. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Структурно-функциональная характеристика эндотелиальных клеток сосудов сердца новорожденной крысы (иммуногистохимическое исследование). Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018;17(2):78–83. DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-78-83. *Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE. Structural and functional characteristics of endothelial cells of vessels of the heart of newborn rats (immunohistochemical study). Regional blood circulation and microcirculation. 2018;17(2):78–83 (In Russ.)*. DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-78-83.
  19. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Изучение строения развивающегося эпикарда и особенностей васкуляризации в сердце новорожденных крыс. Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017;2(34):12–18. Доступно по адресу: [http://invetbio.spb.ru/avvb/avvb\\_2017\\_02.pdf](http://invetbio.spb.ru/avvb/avvb_2017_02.pdf) (получено 23.08.2022). *Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE. Study of the structure of developing epicardium and vascularization in the heart of newborn rats. Actual Question in Veterinary Biology. 2017;2(34):12–18. Available from: http://invetbio.spb.ru/avvb/avvb\_2017\_02.pdf (accessed 23.08.2022).*

### Информация об авторах

Вера Владимировна Иванова – кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета.

Ольга Николаевна Серебрякова – аспирант, ассистент кафедры морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета.

Алексей Вячеславович Калиновский – студент 4-го курса медико-биологического факультета Сибирского государственного медицинского университета.

Ирина Владимировна Суходоло – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета.

Иван Васильевич Мильто – доктор биологических наук, доцент, исполняющий обязанности заведующего кафедрой морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, заместитель директора по научной работе Северского биофизического научного центра.

### Author information

Vera V. Ivanova – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2530-1112>

Olga N. Serebryakova – Postgraduate Student, Assistant, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2924-0724>

Aleksej V. Kalinovskij – 4th year Student, Medicobiological Faculty, Siberian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-7950-4847>

Irina V. Sukhodolo – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor of the Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University. <http://orcid.org/0000-0001-9848-2068>

Ivan V. Milto – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head (actg.) of the Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University; Deputy Director for Research, Seversk Biophysical Research Center. <https://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

## Остеоинтегративные свойства имплантатов из титанового сплава с различным диаметром пор в эксперименте

Н.Ю. Орлинская, С.А. Герасимов, Д.Я. Алейник, Д.В. Захарова,  
К.В. Кулакова, И.Н. Чарыкова, Е.А. Морозова

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

**Резюме.** *Введение.* Аддитивные технологии позволяют создать имплантаты для замещения костных дефектов разной формы со сложной пористой структурой. Тем не менее остается актуальным вопрос об оптимальных параметрах пористой структуры. Цель исследования – изучить биосовместимость имплантатов, изготовленных из титанового сплава, с различным диаметром пор в эксперименте.

*Материалы и методы.* Исследование проводилось в два этапа. Первый этап – исследование *in vitro* – на тестовых культурах диплоидных фибробластов человека для оценки цитотоксичности титанового сплава, из которого были изготовлены образцы для постановки второго этапа *in vivo*. Исследование *in vivo* велось на трех группах кроликов (n=18), которым устанавливали образцы разработанных имплантатов. Средний возраст особей составил 7±1 месяц, вес – 4675±258 граммов. Все образцы имели диаметр 4 мм и высоту 6 мм. В группе 1 размер пор составил 100 мкм, в группе 2 – 200 мкм, в группе 3 – 400 мкм, пористость – 55, 62, 70%, соответственно. Выведение животных из эксперимента осуществляли на 90-е сутки с момента установки образцов. Затем сделаны гистологическое, морфологическое и электронномикроскопическое исследования для оценки остеоинтегративных свойств имплантатов.

*Результаты.* В исследовании *in vitro* не было обнаружено токсического воздействия материала на тестовую культуру. В исследовании *in vivo* результаты гистологического анализа не выявили воспалительного процесса в переимплантных тканях во всех трех группах. По данным морфологического исследования новообразованная ткань в области сформированного дефекта состояла из молодых костных трабекул с расположенными на их поверхности остеобластами. В группе 3 выявлена наибольшая распространенность зрелых костных трабекул по сравнению с группами 1 и 2. У образцов с диаметром пор 400 мкм выявлена более высокая площадь заполнения имплантата новообразованной костной тканью.

*Заключение.* Самыми высокими остеоинтегративными свойствами обладают образцы с диаметром пор 400 мкм.

**Ключевые слова:** остеоинтеграция, биосовместимость, титановые имплантаты, аддитивные технологии, 3D печать

**Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Орлинская. E-mail: norlinskaya@mail.ru

**Для цитирования:** Орлинская Н.Ю., Герасимов С.А., Алейник Д.Я., Захарова Д.В., Кулакова К.В., Чарыкова И.Н., Морозова Е.А. Остеоинтегративные свойства имплантатов из титанового сплава с различным диаметром пор в эксперименте. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):69–76. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.69-76.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Приволжского исследовательского медицинского университета Минздрава России (№ 121030100312-0).

Статья поступила 17.06.2022. Получена после рецензирования 29.06.2022. Принята в печать 15.09.2022.

## Osseointegration properties of titanium implants with different pore diameters: experimental study

N.Yu. Orlynskaya, S.A. Gerasimov, D.Ya. Aleynik, D.V. Zakharova,  
K.V. Kulakova, I.N. Charykova, E.A. Morozova

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Additive technologies make it possible to create implants to replace bone defects. Determining the optimal parameters of a porous structure remains an urgent issue. The experimental research aimed to study the biocompatibility of implants made of titanium alloy with different pore diameters.

**Materials and methods.** The study was carried out in two stages. The first stage included an *in vitro* study carried out on test cultures of diploid human fibroblasts to assess the cytotoxicity of the titanium alloy, from which samples were made for the second stage *in vivo*. The *in vivo* study was performed on three groups of rabbits ( $n=18$ ), which received samples of the developed implants. The average age of subjects was  $7\pm 1$  months, the weight being  $4.675\pm 258$  g. All samples were 4 mm in diameter and 6 mm high. In group 1, the pore size was 100  $\mu\text{m}$ ; in group 2 – 200  $\mu\text{m}$ ; and in group 3 – 400  $\mu\text{m}$ ; the porosity was 55%, 62%, and 70%, respectively. The animals were sacrificed on day 90 after placement of the samples. Histological, morphological, and electron microscopic studies were performed to assess the osseointegrative properties of the implants. **Results.** In the *in vitro* study, we detected no toxic effects of the material on the test culture. In the *in vivo* study, the histological analysis did not reveal inflammation in peri-implant tissues in any of the groups. The morphological study showed a newly formed tissue in the area of the formed defect which consisted of young bone trabeculae with osteoblasts located on their surface. In group 3, we found the greatest prevalence of mature bone trabeculae. The samples with a 400- $\mu\text{m}$  pore diameter revealed the largest area of filling the implant with newly formed bone tissue.

**Conclusion.** Samples with a pore diameter of 400  $\mu\text{m}$  have the highest osseointegrative properties.

**Keywords:** osteointegration, biocompatibility, titanium implants, additive technologies, 3D-printing

**Corresponding author:** Natalia Yu. Orlinskaya. E-mail: norlinskaya@mail.ru

**For citation:** Orlinskaya N. Yu., Gerasimov S. A., Aleynik D. Ya., Zakharova D. V., Kulakova K. V., Charykova I. N., Morozova E. A. Osseointegration properties of titanium implants with different pore diameters: experimental study. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(2):69–76 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.69-76.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Privolzhsky Research Medical University (No. 121030100312-0).

**Received** 17.06.2022 **Received in revised form** 29.06.2022. **Accepted** 15.09.2022.

## Введение

К 2030 году ожидается многократное увеличение числа вмешательств по ревизионному эндопротезированию тазобедренного и коленного суставов [1]. Одной из наиболее частых причин повторных операций является расшатывание компонентов эндопротеза [2, 3]. Это обусловлено отсутствием прочной первичной и/или вторичной фиксации имплантата. На процесс остеоинтеграции влияет ряд разных факторов, которые связаны со средой имплантат–кость, а также с характеристиками самой металлоконструкции [4].

Во избежание резорбции окружающей костной ткани имплантат должен иметь пористую структуру [5, 6], способствующую миграции и пролиферации остеобластов и мезенхимальных стволовых клеток, транспортировке питательных веществ и кислорода, необходимых для васкуляризации во время роста костной ткани [7, 8]. По данным литературы, размер пор и структура также влияют и на остеокондукцию [9, 10]. Согласно Yu. Yasenchuk et al., поры малого диаметра (<100 мкм) могут препятствовать диффузии питательных веществ и метаболитов, но стимулировать остеогенез, снижая пролиферацию клеток [11]. В свою очередь, поры большого диаметра (>500 мкм) могут ингибировать адгезию клеток, уменьшая образование костной ткани и вращение сосудов [11].

В настоящее время в травматологии и ортопедии активно применяются аддитивные технологии, с помощью которых создаются индивидуальные имплантаты для замещения костных дефектов. Титан и его сплав Ti6Al4V получили широкое распространение в качестве материала для изготовления металлоконструкций

медицинского назначения ввиду высоких механических свойств, хорошей биосовместимости и устойчивости к коррозии [12–16]. Современные методы и возможности 3D печати позволяют создать имплантаты разной формы со сложной пористой структурой и с разным размером пор [4]. Тем не менее остается актуальным вопрос об оптимальных параметрах пористой структуры, в том числе размере диаметра пор.

Цель исследования – изучить биосовместимость имплантатов, изготовленных из титанового сплава, с различным диаметром пор в эксперименте.

## Материалы и методы

Исследование проводилось в два этапа: первый этап – исследование *in vitro*, где осуществлялась оценка цитотоксичности материала, из которого были изготовлены образцы для проведения второго этапа *in vivo*. Исследование *in vitro* проводилось на тестовых культурах диплоидных фибробластов человека для оценки цитотоксичности материала образцов имплантатов на основе межгосударственного стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2011 (Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro* ISO 10993-5:1999, IDT) методом прямого контакта. Для исследования формировали три серии: контрольная серия – культура без образцов (девять чашек Петри), культура с отрицательными контрольными образцами (медицинский титан) (девять чашек Петри), культура с опытными образцами (разработанный имплантат из титанового сплава Ti6Al4V) (восемь чашек Петри). Для оценки воздействия исследуемых образцов на клетки культуры в процессе роста регистрировали состояние

культуры после взаимодействия с образцами через 24, 48, 72 часа. Для визуальной оценки состояния культуры использовали инвертированный микроскоп Leica DMI 3000B (Leica Microsystems, Германия), оснащенный программой визуализации изображений LAZ.V.4.3. Оценивали визуальные параметры – характер монослоя, морфологию клеток и фиксировали состояние культуры. После видеоархивирования клетки с поверхности пластика снимали с помощью 0,25% раствора трипсина («ПанЭко», Россия) в версене («ПанЭко», Россия) и подсчитывали количество клеток в каждой чашке Петри. Одновременно с использованием исключаяющей окраски трипановым синим оценивали долю жизнеспособных клеток. Клетки с каждой чашки подсчитывали дважды: на счетчике Countes II (Invitrogen, США) и дублировали полученные результаты с помощью подсчета в камере Горяева в четырех полях зрения. Общее число полей зрения для культуры без образцов составило 72, для культуры с отрицательным контрольным образцом (медицинский титан) – 72, для культуры с опытным образцом – 64.

*Исследование in vivo.* В исследование были включены 18 самцов кроликов породы советская шиншилла. Возраст особей составил в среднем  $7 \pm 1$  месяца, вес –  $4675 \pm 258$  граммов. Эксперимент осуществляли согласно требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 2014). Все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 11 от 09.06.2021).

Исследование проводили на трех группах кроликов, в каждой были установлены образцы имплантатов, изготовленные из титанового сплава (Ti6Al4V) посредством аддитивных технологий с применением электроннолучевой плавки. Размер пор в исследуемых образцах был равен 100 мкм (n=6, группа 1), 200 мкм (n=6, группа 2), 400 мкм (n=6, группа 3), пористость – 55, 62, 70%, соответственно (табл. 1). Все образцы имели цилиндрическую форму с гексагональной упорядоченной структурой диаметром 4 мм и высотой 6 мм. Выведение

животных из эксперимента осуществляли на 90-е сутки от момента установки образца имплантата.

*Техника операции.* Оперативное вмешательство проводили в условиях стерильной операционной. Обезболивание осуществляли препаратами 1 мл Zoletil (Virbac, Франция) и 1 мл XylaVET (Pharmamagist, Венгрия). Подготовка операционного поля и рук хирурга проводились согласно принятым стандартам. Продолжительность операции составила 30 минут. В положении животного на боку осуществляли хирургический доступ (1,5 см) к дистальному отделу бедренной кости по внутренней поверхности через медиальную головку четырехглавой мышцы. При помощи полого остеотома (диаметр 4 мм) формировали канал, соответствующий размерам и форме имплантатов. В образованный дефект устанавливали образец имплантата, после чего проводили санацию операционной раны, послойно ее ушивали и накладывали асептическую повязку. Выполняли рентгеновский контроль с помощью С-дуги (рис. 1). В послеоперационном периоде в течение 10 дней проводили перевязки и мониторинг операционной раны.



Рис. 1. Контрольная рентгенограмма нижней конечности кролика, выполненная после имплантации образца. Образец имплантата (диаметр пор 200 мкм), кролик № 10

Fig. 1. Control X-ray of the lower extremity of a rabbit taken after sample implantation. Implant sample (pore diameter 200  $\mu\text{m}$ ), rabbit No. 10

Таблица 1 | Table 1

Экспериментальные группы | Experimental groups

№ группы   Group	Диаметр пор, мкм   Pore diameter, $\mu\text{m}$	Число образцов имплантатов   Number of implant samples	Число животных   Number of animals
1	100	6	6
2	200	6	6
3	400	6	6

Через 90 суток животных выводили из эксперимента с помощью воздушной эмболии под наркозом со взятием нижних третей бедренных костей с имплантатами.

**Гистологическое исследование.** Экспериментальный материал фиксировали в 10% формалине и декальцинировали в бескислотном растворе декальцинирующей жидкости. Затем образцы имплантатов осторожно удаляли из костной ткани и отправляли на электронную микроскопию. Костную ткань подвергали стандартной гистологической проводке на аппарате Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), далее осуществляли заливку в парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, Великобритания).

Серийные срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, Великобритания). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином при помощи станции для окрашивания Gemini AS (Thermo Scientific, Великобритания).

Для морфометрической обработки и создания видеархива полученного материала использовали микроскоп Leica 2500 (Leica Microsystems, Германия), объектив  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ .

Электронномикроскопические исследования предварительно зафиксированных в формалине, высушенных при комнатной температуре на фильтровальной бумаге и закрепленных на подложках из двухстороннего электропроводящего углеродного скотча на предметодержателе образцов выполняли в центре коллективного пользования ННГУ им. Н.И. Лобачевского с применением сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-IT300LV (JEOL Japanese Electron Optics Laboratory, Япония) в режиме низкого вакуума при низких значениях тока зонда ( $< 0,1$  нА), чтобы уменьшить как воздействие электронного пучка на исследуемые образцы (диаметр электронного зонда до 3 нм), так и эффекты статической зарядки поверхности образцов, негативно влияющих на изображение. Дополнительная пробоподготовка для получения наглядных и легко интерпретируемых трехмерных изображений структуры поверхности образцов имплантатов, идентификации отдельных компонентов по структурным

особенностям и топографии индивидуальных элементов, равно как и дополнительное контрастирование не требовались.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica v.12.5 (StatSoft, США). Для определения типа распределения данных использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Для выявления статистических различий применяли критерий Стьюдента для независимых выборок. Количественные данные представлены в виде  $M \pm SD$  ( $M$  – среднее значение,  $SD$  – стандартное отклонение). Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ . Статистическую обработку размеров площади визуализируемых кластеров костной ткани в полях обзора осуществляли с помощью программы для анализа и обработки изображений (ImageJ, National Institute of Health, США) автоматически.

### Результаты

**Исследование *in vitro*.** На всех сроках исследования (24, 48, 72 часа) в опытной серии отчетливо определялись клетки характерной фибробластоподобной морфологии, веретеновидной формы с четкими ядрами и хорошо выраженными отростками; наблюдали делящиеся клетки. Рост культуры был равномерным в виде конфлюэнтного монослоя. Подсчитывали плотность клеток, количество погибших клеток (табл. 2, 3).

На всех сроках исследования повреждения клеток не выявлены. Клетки сохраняли типичную для фибробластов веретеновидную форму с четкими контурами и выраженными отростками, ядра плотные, хорошо видны ядрышки, цитоплазма гомогенная. Разрушения и деформации клеток, а также нарушения целостности монослоя вокруг образцов не зафиксированы. Во всех сериях сохранялся типичный рисунок монослоя в виде завитков. pH среды на протяжении всего периода эксперимента не изменялась.

**Исследование *in vivo*.** При гистологическом анализе ни в одной из групп имплантированных образцов не были выявлены признаки воспаления периимплантных тканей, образование гранулем инородных тел или формирование грубой соединительной ткани (рис. 2 А–С).

Таблица 2 | Table 2

Изменение плотности клеток в процессе взаимодействия (плотность клеток/см<sup>2</sup>) |  
Change in cell density during interaction (cell density/cm<sup>2</sup>)

Сроки после внесения образца   Time periods after sample submission	Контроль (без образцов)   Control (without samples)	Отрицательный контрольный образец (медицинский титан)   Negative control (medical titanium)	Опыт   Experiment
24 часа   24 hours	27642,74±1368,52	33648±1254,4	24878,46±85,64
48 часов   48 hours	45741,46±3332,41	45550,9±865,8	42075,16±1866,8
72 часа   72 hours	50047,90±763,22	48884,2±986,8	50455,27±726,86

Ни в одной из контрольных точек не были выявлены статистически значимые отличия между показателями в группах эксперимента ( $p > 0,05$ )

None of the control points revealed statistically significant differences between the indicators in the experimental groups ( $p > 0.05$ )



Таблица 3 | Table 3

## Изменение жизнеспособности клеток в процессе взаимодействия (%) | Changes in the cell viability during interaction (%)

Сроки после внесения образца   Day after sample submission	Контроль (без образцов)   Control (without samples)	Отрицательный контрольный образец (медицинский титан)   Negative control (medical titanium)	Опыт   Experiment
24 часа   24 hours	98,3±0,49	99,1±0,52	98,3±0,26
48 часов   48 hours	99±0,16	98,9±0,25	98,6±0,32
72 часа   72 hours	99,1±0,15	98,7±0,29	98,8±0,15

Ни в одной из контрольных точек не были выявлены статистически значимые отличия между показателями в группах эксперимента ( $p>0,05$ )

None of the control points revealed statistically significant differences between the indicators in the experimental groups ( $p>0.05$ )

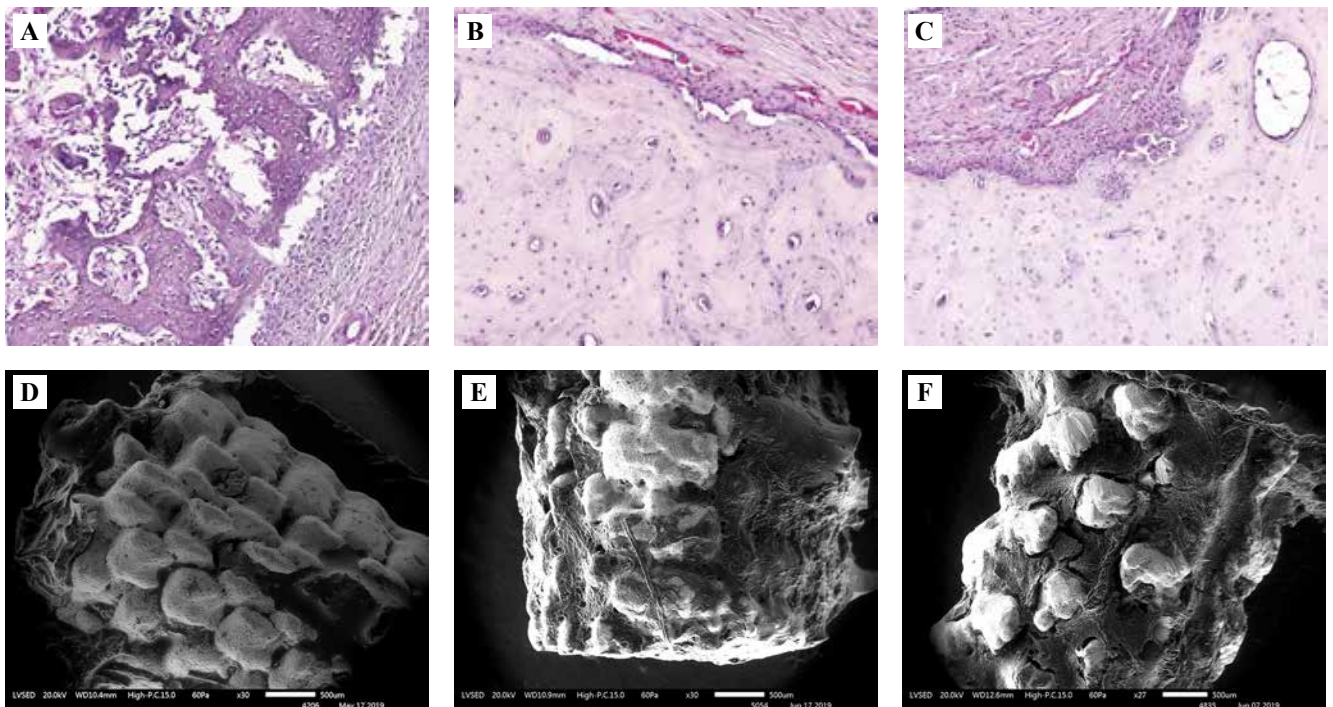


Рис. 2. Морфологическое исследование экспериментального материала.

A, D – группа 1 (диаметр пор 100 мкм). А – межтрабекулярные пространства с низкой клеточностью и васкуляризацией, в периферических отделах области внедрения имплантата остеогенез идет за счет молодых костных трабекул. D – слабое образование кости в перимплантной зоне. В, Е – группа 2 (диаметр пор 200 мкм). В – в зоне имплантата соединительная ткань, а также костная ткань, состоящая из молодых костных трабекул, межтрабекулярные пространства с умеренной клеточностью и васкуляризацией. Е – умеренное образование кости в перимплантной зоне. С, F – группа 3 (диаметр пор 400 мкм). С – выраженная васкуляризация и высокая клеточность межтрабекулярных пространств, в периферических отделах области внедрения имплантата остеогенез идет за счет молодых костных трабекул, врастающих из материнского ложа, по краям трабекул располагаются остеобласты. F – наличие массивного слоя кости на поверхности имплантата. А–С – окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ . D–F – СЭМ, изображение получено в сигнале низкоэнергетичных вторичных электронов в режиме низкого вакуума. D, E –  $\times 30$ , F –  $\times 27$

Fig. 2. Morphological evaluation of the experimental material.

A, D – group No. 1 (pore diameter 100  $\mu\text{m}$ ). A – the formed bone tissue in the implant area consists of young bone trabeculae with osteoblasts located on their surface. Intertrabecular spaces with low cellularity and vascularization. In the peripheral parts of the implant insertion area, osteogenesis is due to young bone trabeculae. D – weak bone formation in the periimplant zone. B, E – group No. 2 (pore diameter 200  $\mu\text{m}$ ). B – connective tissue in the implant area as well as bone tissue consisting of young bone trabeculae. Intertrabecular spaces with moderate cellularity and vascularization. E – moderate bone formation in the periimplant zone. C, F – group No. 3 (pore diameter 400  $\mu\text{m}$ ). C – pronounced vascularization and high cellularity of intertrabecular spaces. In the peripheral parts of the implant insertion area, osteogenesis occurs due to young bone trabeculae growing from the maternal bed osteoblasts are located along the edges of the trabeculae. F – the presence of a massive bone layer on the implant surface. A–C – H&E stain,  $\times 200$ . D–F – SEM, the image obtained in the signal of low-energy secondary electrons in the low-vacuum mode. D, E –  $\times 30$ , F –  $\times 27$

По результатам морфологического исследования выявлено, что в области смоделированного костного дефекта между установленными имплантатами и материнским ложем образуется ткань, состоящая из молодых костных трабекул с расположенными на их поверхности остеобластами. В группе 3 с диаметром пор 400 мкм по периферии области внедрения имплантата наблюдались зрелые костные трабекулы, их распространенность выше, чем в образцах с размером пор 100 мкм и 200 мкм. Кроме того, у образцов с диаметром 400 мкм новообразованная костная ткань в области операционного дефекта прилежала непосредственно к имплантатам. Также в группе 3 отсутствовали признаки склерозирования, такие как суженные гаверсовы каналы, мозаичное строение ткани, которые отмечены в образцах групп 1 и 2.

При электронномикроскопическом исследовании учитывали заполнение костными структурами пор изучаемых имплантатов. При исследовании образцов группы 1 установлено, что поры изучаемых имплантатов заполнены по всей площади костными структурами разной степени зрелости, однако глубина заполнения в этой группе меньше, чем в группах 2 и 3 (рис. 2 D–F). При сравнительной характеристике имплантатов группы 3 с другими группами исследования обнаружено, что зрелые трабекулы с четко выраженным остеоцитарным строением, присущим зрелой структуре, занимают большую площадь по сравнению с имплантатами из групп 1 и 2.

Проведенный расчет площади визуализируемых кластеров костной ткани показал, что площадь заполнения новообразованной костной тканью тем больше, чем больше диаметр пор исследуемых образцов имплантатов (рис. 3). Установлено, что через 90 суток после имплантации при диаметре пор 200 мкм (группа 2) площадь костной ткани на единицу площади имплантата была больше, чем при диаметре пор 100 мкм (группа 1), на 157%, а при диаметре пор 400 мкм

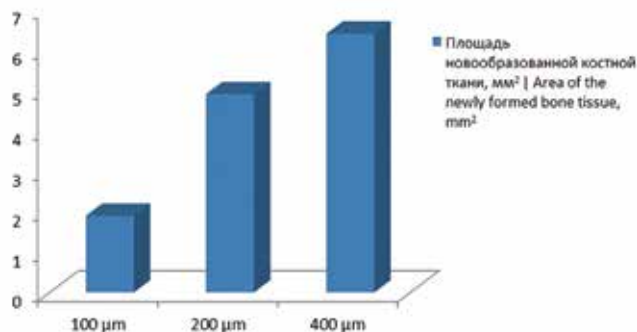


Рис. 3. Сравнение площади заполнения новообразованной костной тканью поверхности имплантатов с разным диаметром пор

Fig. 3. Comparison of the area of filling with newly formed bone tissue of the surface of implants with different pore diameters

(группа 3) – на 236%, чем при диаметре пор 100 мкм и, соответственно, на 30,6% больше, чем при диаметре пор 200 мкм (группа 2).

## Обсуждение

Биологическое поведение клеток, отвечающих за остеоинтеграцию, в значительной степени определяется особенностями структуры поверхности имплантата, морфологией, гидрофильностью [17, 18]. Остеоинтеграция требует от 6 недель до 3 месяцев, это сложный последовательный процесс, который завершается образованием костной ткани на границе имплантат–кость [19, 20].

В нашем исследовании на сроке 90 суток во всех трех группах были обнаружены признаки зрелой костной структуры, однако наибольшая площадь ее распространения отмечена в образцах с диаметром пор 400 мкм.

Н. Wang et al. сравнивали остеоинтегративные, osteoconductive характеристики имплантатов (размеры 5×8 мм), изготовленных с помощью 3D печати, из тантала и титана, с диаметром пор, равным 500 мкм [21]. Более быстрая регенерация костной ткани в первые две недели была зафиксирована в группе с танталом, затем данный процесс постепенно замедлялся. У титановых образцов через 8 недель наблюдалась костная интеграция, внутреннее пространство практически полностью было заполнено костной тканью.

L. Li et al. разработали три пористые структуры на основе модели трижды периодической минимальной поверхности (Triply periodic minimal surfaces, TPMSs) [22], имитирующие физические свойства натуральной кости. Диапазон распределения пор составил 300–500 мкм, 200–600 мкм, 100–700 мкм. Через пять недель объем образованной костной ткани имел наибольшую площадь у имплантатов с размером пор 100–700 мкм.

A. Pea et al. в эксперименте на кроликах исследовали имплантаты из титанового сплава с диаметром пор 800 и 1000 мкм [23]. По результатам микроскопии через два месяца у образцов с меньшим размером пор определялась губчатая кость с плотными трабекулами с остеобластами на поверхностях, ареолами с костным мозгом, отмечалось прорастание костной ткани в поры образца. У других образцов определялась хрящевая ткань с увеличенными хондроцитами в лакунах на границе с имплантатом и ретикулофиброзная костная ткань в толще имплантата. Процесс остеоинтеграции протекал быстрее у имплантатов с диаметром пор 800 мкм.

Данные представленных работ, основанные на исследованиях образцов с диаметром пор от 100 мкм до 1000 мкм, демонстрируют разную степень остеоинтеграции в разных образцах, при этом сравниваются группы со значительной разницей в размере диаметра пор. В своем исследовании мы постарались отследить взаимосвязь между диаметром пор титановых имплантатов и степенью остеоинтеграции посредством использования образцов с меньшей разницей в диаметре

пор. Проведенный расчет площади визуализируемых кластеров костной ткани показал прямую зависимость площади заполнения новообразованной костной тканью от диаметра пор исследуемых образцов имплантатов. Таким образом, наилучшие показатели были выявлены у образцов с диаметром пор 400 мкм.

Проведенное нами исследование имеет ряд ограничений: небольшие группы для сравнения, выбрана только одна контрольная точка (90 суток) для оценки остеоинтегративных свойств имплантатов.

### Заключение

По результатам исследования имплантаты из титанового сплава обладают хорошей биосовместимостью и не оказывают цитотоксического воздействия на ткани организма. Во всех трех группах в области сформированного дефекта между установленными образцами и материнским ложем образовывалась ткань. Признаки более зрелой костной структуры наблюдались в образцах с диаметром пор 400 мкм. В этой же группе новообразованная ткань с остеоцитарным строением занимала наибольшую площадь в образцах. На основании проведенных расчетов была выявлена зависимость между размером пор и площадью заполнения костной тканью.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.Ю. Орлинская, С.А. Герасимов.

Сбор и обработка материала – Д.Я. Алейник, Н.Ю. Орлинская, К.В. Кулакова, И.Н. Чарыкова.

Написание текста – Н.Ю. Орлинская, Д.В. Захарова, Е.А. Морозова.

Редактирование – Н.Ю. Орлинская, С.А. Герасимов, Д.Я. Алейник.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.Yu. Orlinskaya, S.A. Gerasimov.

Collected the data and performed the analysis – D.Ya. Aleynik, N.Yu. Orlinskaya, K.V. Kulakova, I. N. Charykova.

Wrote the paper – N.Yu. Orlinskaya, D.V. Zakharova, E.A. Morozova.

Edited the manuscript – N.Yu. Orlinskaya, S.A. Gerasimov, D.Ya. Aleynik.

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

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

### Литература/References

- Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(4):780–5. DOI: 10.2106/JBJS.F.00222.
- Kärrholm J, Rogmark C, Naucler E, Nätman J, Vinblad J, Mohaddes M et al. Swedish Hip Arthroplasty Register Annual report 2019. 2021. 195 p. DOI: 10.18158/H1BdmrOWu.
- Robertson O, Lidgren L, Sundberg M, W-Dahl A. The Swedish Knee Arthroplasty Register Annual report 2020. Lund: Media-Tryck, 2020. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/345602419> (accessed 17.05.2022).
- Liu Y, Rath B, Tingart M, Eschweiler J. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. *J Biomed Mater Res A.* 2020;108(3):470–84. DOI: 10.1002/jbm.a.36829.
- Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Reasons for failures of oral implants. *J Oral Rehabil.* 2014;41(6):443–76. DOI: 10.1111/joor.12157.
- Osman WS, Bassiony AA, Asal MK, El Ghazaly SA, Otb A. Failure of a properly positioned tantalum rod for treatment of early femoral head necrosis and conversion to total hip arthroplasty. *Eur Orthop Traumatol.* 2015;6:409–15. DOI: 10.1007/s12570-015-0317-z. 7. Chen Y, Frith JE, Dehghan-Manshadi A, Attar H, Kent D, Soro NDM et al. Mechanical properties and biocompatibility of porous titanium scaffolds for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017;75:169–74. DOI: 10.1016/j.jmbm.2017.07.015.
- Arabnejad S, Burnett Johnston R, Pura JA, Singh B, Tanzer M, Pasini D. High-strength porous biomaterials for bone replacement: a strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints. *Acta Biomater.* 2016;30:345–56. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.10.048.
- Ran Q, Yang W, Hu Y, Shen X, Yu Y, Xiang Y et al. Osteogenesis of 3D printed porous Ti6Al4V implants with different pore sizes. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;84:1–11. DOI: 10.1016/j.jmbm.2018.04.010.
- Taniguchi N, Fujibayashi S, Takemoto M, Sasaki K, Otsuki B, Nakamura T et al. Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;59:690–701. DOI: 10.1016/j.msec.2015.10.069.
- Yasenчук Y, Marchenko E, Gunther V, Radkevich A, Kokorev O, Gunther S et al. Biocompatibility and clinical application of porous TiNi alloys made by self-propagating high-temperature synthesis (SHS). *Materials (Basel).* 2019;12(15):2405. DOI: 10.3390/ma12152405.
- Tamaddon M, Samizadeh S, Wang L, Blunn G, Liu C. Intrinsic osteoinductivity of porous titanium scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biomater.* 2017;2017:5093063. DOI: 10.1155/2017/5093063.
- Hanawa T. Titanium–tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:170. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00170.
- Ahn TK, Lee DH, Kim TS, Jang GC, Choi S, Oh JB et al. Modification of titanium implant and titanium dioxide for bone tissue engineering. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1077:355–68. DOI: 10.1007/978-981-13-0947-2\_19.
- Liang H, Yang Y, Xie D, Li L, Mao N, Wang C et al. Trabecular-like Ti-6Al-4V scaffolds for orthopedic: Fabrication by selective laser melting and in vitro biocompatibility. *J Mater Sci Technol.* 2019;35(7):1284–97. DOI: 10.1016/j.jmst.2019.01.012.
- Wang X, Xu S, Zhou S, Xu W, Leary M, Choong P et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials.* 2016;83:127–41. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012.
- Wang Q, Huang Y, Qian Z. Nanostructured surface modification to bone implants for bone regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2018;14(4):628–48. DOI: 10.1166/jbn.2018.2516.

18. *Boyan BD, Lotz EM, Schwartz Z.* Roughness and hydrophilicity as osteogenic biomimetic surface properties. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(23–24):1479–89. DOI: 10.1089/ten.TEA.2017.0048.
19. *Jo YK, Choi BH, Zhou C, Ahn JS, Jun SH, Cha HJ.* Bioengineered mussel glue incorporated with a cell recognition motif as an osteostimulating bone adhesive for titanium implants. *J Mater Chem B.* 2015;3(41):8102–14. DOI: 10.1039/c5tb01230a.
20. *Yoo JJ, Park YJ, Rhee SH, Chun HJ, Kim HJ.* Synthetic peptide-conjugated titanium alloy for enhanced bone formation in vivo. *Connect Tissue Res.* 2012;53(5):359–65. DOI: 10.3109/03008207.2012.663837.
21. *Wang H, Su K, Su L, Liang P, Ji P, Wang C.* Comparison of 3D-printed porous tantalum and titanium scaffolds on osteointegration and osteogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;104:109908. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109908.
22. *Li L, Shi J, Zhang K, Yang L, Yu F, Zhu L et al.* Early osteointegration evaluation of porous Ti6Al4V scaffolds designed based on triply periodic minimal surface models. *J Orthop Translat.* 2019;19:94–105. DOI: 10.1016/j.jot.2019.03.003.
23. *Ilea A, Vrabie OG, Băbțan AM, Miclăuș V, Ruxanda F, Sárközi M et al.* Osseointegration of titanium scaffolds manufactured by selective laser melting in rabbit femur defect model. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(2):26. DOI: 10.1007/s10856-019-6227-9.

### Информация об авторах

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

Сергей Александрович Герасимов – кандидат медицинских наук, заведующий ортопедическим отделением (взрослых) университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Диана Яковлевна Алейник – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий Приволжского исследовательского медицинского университета.

Дарья Валерьевна Захарова – врач травматолог-ортопед ортопедического отделения (взрослых) университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Ксения Владимировна Кулакова – кандидат биологических наук, научный сотрудник группы патологической анатомии университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Ирина Николаевна Чарыкова – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биотехнологий университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Екатерина Александровна Морозова – лаборант-исследователь университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

### Author information

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

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

Sergey A. Gerasimov – Cand. Sci. (Med.), Head of Adult Orthopedics Department, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3179-9770>

Diana Ya. Aleynik – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-1482-4281>

Daria V. Zakharova – Orthopedic Surgeon, Adult Orthopedics Department, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-2654-911X>

Kseniia V. Kulakova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Pathology Research Group, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-8529-1326>

Irina N. Charykova – Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Biotechnology, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-0866-7857>

Ekaterina A. Morozova – Research Assistant, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-7548-9398>

## Репаративная регенерация сухожилия под влиянием секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: экспериментальное исследование

М.Д. Качалин<sup>1</sup>, Е.Н. Борхунова<sup>1</sup>, С.В. Полябин<sup>1</sup>, Л.М. Михалева<sup>2</sup>,  
Д.А. Арешидзе<sup>2</sup>, М.А. Козлова<sup>2</sup>, А.И. Довгий<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени академика К.И. Скрябина, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>3</sup> ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии», Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Совершенствование методов лечения пациентов с травмами сухожилий является актуальной задачей биологии и медицины. Особенности строения сухожилий обуславливают их заживление с формированием рубцовой ткани при длительном сохранении очагов дистрофии. Это приводит к хронизации и рецидивированию тендинитов. Одним из способов улучшения результатов лечения при тендинитах может стать применение клеточных продуктов, в частности секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), со стандартизированной концентрацией цитокинов – провоспалительных и противовоспалительных и факторов роста. Однако репаративная регенерация сухожилий под влиянием секрета до сих пор не была изучена. Этой теме и посвящена данная статья.

*Материалы и методы.* Работа проведена на белых беспородных крысах (самцы, масса 120 граммов), которых подразделяли на три группы: группа I сравнения (n=35), группа II – опытная (n=35), группа III – контрольная (интактная, n=25). Животным групп I и II под изофлюрановым наркозом рассекали пяточное сухожилие, накладывали шов, после чего наносили физиологический раствор (группа I) или секретом (группа II). Рану ушивали, повторное введение препаратов проводили через неделю. Животных выводили из эксперимента через 1, 7, 14 и 60 суток. Материал изучали методами световой и трансмиссионной микроскопии. Проводили также микроскопическую морфометрию гистосрезов.

*Результаты.* Показано, что под влиянием секрета МСК репарация сухожилия происходит на фоне менее выраженного воспаления без развития дистрофических изменений. В ткани регенерата пучки коллагеновых волокон расположены преимущественно взаимопараллельно, количество фибробластов немного выше нормы, васкуляризация нормализуется. В контроле на протяжении всего периода исследования сохранялись признаки отека и дистрофии, регенерат представлял собой гиповаскулярную рубцовую ткань, богатую фибробластами. Толщина регенерата сухожилия в опытной группе превышала таковую в контрольной.

*Заключение.* Секретом МСК положительно действует на репарацию сухожилия, а выявленные структурные характеристики регенерата могут свидетельствовать о восстановлении его функциональной полноценности.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, секретом, цитокины, сухожилие, травма, репаративная регенерация

**Для корреспонденции:** Елена Николаевна Борхунова. E-mail: borhunova@mail.ru

**Для цитирования:** Качалин М.Д., Борхунова Е.Н., Полябин С.В., Михалева Л.М., Арешидзе Д.А., Козлова М.А., Довгий А.И. Репаративная регенерация сухожилия в условиях применения секрета стволовых клеток: экспериментальное исследование. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):77–88. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.77-88.

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

Статья поступила 06.10.2022. Получена после рецензирования 10.11.2022. Принята в печать 12.12.2022.

# Reparative tendon regeneration influenced by multipotent mesenchymal stromal cell secretome: experimental study

M.D. Kachalin<sup>1</sup>, E.N. Borkhunova<sup>1</sup>, S.V. Pozyabin<sup>1</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>2</sup>,  
D.A. Areshidze<sup>2</sup>, M.A. Kozlova<sup>2</sup>, A.I. Dovgii<sup>3</sup>

<sup>1</sup> K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

<sup>3</sup> T-Helper Cell Technologies, LLC, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Improving treatments for tendon injuries remains a topical issue in biology and medicine. Tendon structure is predisposed to scar formation, with significant regions of dystrophy leading to chronic and recurrent tendinitis. Stem cell regenerative therapy including mesenchymal stromal cell secretome is among promising treatments to improve patient outcomes. Standardized cytokine concentrations can be incorporated into the secretome, which may include both pro- and anti-inflammatory cytokines. This article addresses the use of stromal cell secretome for tendon injury regeneration, which is poorly studied.

**Materials and methods.** The study included 95 white outbred rats (males, weight 120 g), which were divided into three groups: Group I comparison (n=35), Group II experimental (n=35), and Group III control (n=25). Animals in Groups I and II were anesthetized with isoflurane and their calcaneal tendons were dissected and sutured. Animals in Group I were treated with saline solution, whereas Group II received stromal cell secretome. The wounds were subsequently sutured. One week after the manipulation, the animals received the second treatment around the tendon. The animals were withdrawn from the experiment on days 1, 7, 14, and 60. We analyzed the samples using light microscopy with morphometry and transmission electron microscopy.

**Results.** Treating tendons with stromal cell secretome (Group II) is accompanied by less pronounced inflammation and shows no dystrophic changes. The collagen bundles in the regenerate are parallel to each other, with vasculature being normalized and the number of fibroblasts having a slight increase. The control samples, however, showed inflammation, dystrophy, and scarring with hypovascularization of the regenerate. Moreover, the total fibroblast count in the tissue of the control samples elevated significantly. The regenerate in Group II was slightly thicker than in Group III, while in Group I, the regenerate was thinner than in Group III.

**Conclusion.** Mesenchymal stromal cell secretome greatly contributes to tendon healing. Microscopic tendon regenerate structure is similar to that of the intact sample, suggesting its functional recovery.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, secretome, cytokines, tendon, trauma, reparative regeneration

**Corresponding author:** Elena N. Borkhunova. E-mail: borhunova@mail.ru

**For citation:** Kachalin M.D., Borkhunova E.N., Pozyabin S.V., Mikhaleva L.M., Areshidze D.A., Kozlova M.A., Dovgii A.I. Reparative tendon regeneration influenced by multipotent mesenchymal stromal cell secretome: experimental study. *Clin. exp. morphology*. 2023;12(2):77–88 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.77-88.

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

**Received** 06.10.2022. **Received in revised form** 10.11.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

Совершенствование методов лечения пациентов с повреждениями сухожилий остается актуальной задачей биологии и медицины. При тендинитах регенерация обычно завершается формированием в толще сухожилия рубцов и очагов дистрофических изменений, которые в дальнейшем становятся местами наименьшей устойчивости. При функциональной нагрузке на сухожилия в них вновь возникают микроразрывы, что обуславливает хроническое течение тендинитов с перманентным рецидивированием [1–5]. Консервативная терапия при тендинитах, как правило, недостаточно результативна, а хирургическое лечение, в том числе с применением ауто- и аллотрансплантатов, приводит к рубцовым изменениям сухожилия [4–6].

Одним из перспективных методов лечения при тендинитах является использование клеточных продуктов [7–17]. На наш взгляд, для оптимизации репаративной регенерации сухожилий эффективным может оказаться применение секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), содержащего комплекс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и факторов роста и апробированного в ветеринарной практике для лечения язв роговицы различной этиологии и кожных ран [18–20].

Цель исследования – на экспериментальной модели полного разрыва пяточного сухожилия изучить особен-

ности течения репаративной регенерации под влиянием секрета МСК.

### Материалы и методы

Работа проведена на белых беспородных крысах (самцы, масса 120 граммов), которых разделили на три группы: группа I – сравнения (n=35), группа II – опытная (n=35), группа III – контрольная (интактная, n=25). Под общей анестезией (изофлюран) в группах I и II осуществили оперативный доступ к пяточному сухожилию, которое после выделения рассекли скальпелем в поперечном направлении, моделируя тотальный разрыв. После тенорафии с помощью сухожильного шва Ланге (шовный материал полигликолид 6/0), полость раны орошали физиологическим раствором в группе I и секретом МСК в группе II (0,5 мл препарата, экспозиция 2 минуты). Секретом МСК (линия клеток hb-MSC, регистрационный номер Н-154, депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов), использованный в исследовании, содержался в препарате Репарин-Хелпер отечественного производства («Т-Хелпер», Россия), в его составе – комплекс цитокинов (IL-6, IP-10, IL-10, GRO/КС, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, VEGF) [20]. Затем раны ушивали. Повторное введение препарата осуществляли паратенониально через 7 суток после операции (0,2 мл).

Через 1, 7, 14 и 60 суток крыс выводили из эксперимента путем передозировки изофлюрана и брали материал для микроскопических исследований. В группах I и II на 1-е сутки материал взят от пяти животных, на 7-е, 14-е и 60-е сутки – от десяти животных. Для гистологических исследований образцы сухожилья фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин по общепринятой методике и после окрашивания гематоксилином и эозином и по ван Гизону изучали с помощью световой микроскопии и микроскопической морфометрии. Оценивали общую морфологическую картину, а также определяли толщину регенерата сухожилия, толщину пучков коллагеновых волокон регенерата, количество фибробластов и гемокapилляров в стандартном поле зрения (ПЗ) при  $\times 400$ . Показатели групп сравнивали с нормативными показателями интактных (группа III). Исследования проводили с помощью микроскопа Jenamed-2 (Carl Zeiss, Германия), совмещенного с программой цифрового анализа микроскопического изображения ImageScore 4,0 (Leica Biosystems, Германия). В каждой группе для каждого срока готовили 10 срезов с одного объекта (тотальный продольный срез сухожилья), в структуре регенерата выявляли типичную картину, преобладающую во всех ПЗ, подсчет проводили не менее чем в 10 полях зрения. Цифровой материал подвергали статистической обработке с помощью программы Statistica 8.1 (Statsoft, США). Для выявления отличительных количественных характеристик регенерата в группах I и II на разных этапах репарации исполь-

зовали критерий Краскела–Уоллеса, различия считали значимыми при значении  $p \leq 0,05$ .

Для исследований методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) образцы сухожилья размером 2 мм<sup>3</sup> фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,4), дофиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия (OsO<sub>4</sub>), обезвоживали в этаноле по общепринятой схеме, в процессе обезвоживания контрастировали 1% уранилацетатом на 70% этаноле и проводили заливку в смесь эпон–аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (LKB Produkter, Швеция) и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу, после чего изучали с помощью микроскопа JEM-100CX (JEOL, Япония). Фотофиксация препаратов проводилась с помощью камеры Gatan ES500W Erlangshen, Model 782, (Gatan Inc., США). При исследовании осуществляли оценку морфологической картины образцов. Все манипуляции с лабораторными животными проводили согласно директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Работа одобрена комиссией по биоэтике НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 109 от 26.09.2022).

### Результаты

#### *Результаты гистологических исследований*

В группе I через 1 сутки после операции наблюдали некроз ткани сухожилья в области разреза и наложения шва, перифокально в эпитеноне, пери- и эндотеноне отмечали отек и обильную нейтрофильную инфильтрацию с участием макрофагов (рис. 1 А). Паравазально и в толще сухожилья визуализировали многочисленные тучные клетки с признаками дегрануляции. Через 7 суток в структуре регенерата выявлялись тонкие пучки коллагеновых волокон, среди которых располагались многочисленные крупные фибробласты (рис. 1 В), а также большой объем белой жировой ткани, что может быть реактивным изменением в ответ на травму. В регенерате наблюдали многочисленные гемокapилляры и тучные клетки, многие из которых находились в состоянии дегрануляции. Сохранялись умеренная диффузная нейтрофильно-макрофагальная инфильтрация и очаговые дистрофические изменения в виде фибриноидного набухания. Через 14 суток толщина и плотность расположения пучков коллагеновых волокон возрастали, они имели волнистую конфигурацию и переменное расположение: от взаимопараллельного до разнонаправленного. Объем белой жировой ткани уменьшался, она располагалась в межпучковой соединительной ткани и имела признаки фиброза. В богатой фибробластами и гемокapиллярами ткани регенерата (рис. 1 С) по-прежнему наблюдали лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат и тучные клетки, а также очаги деструк-

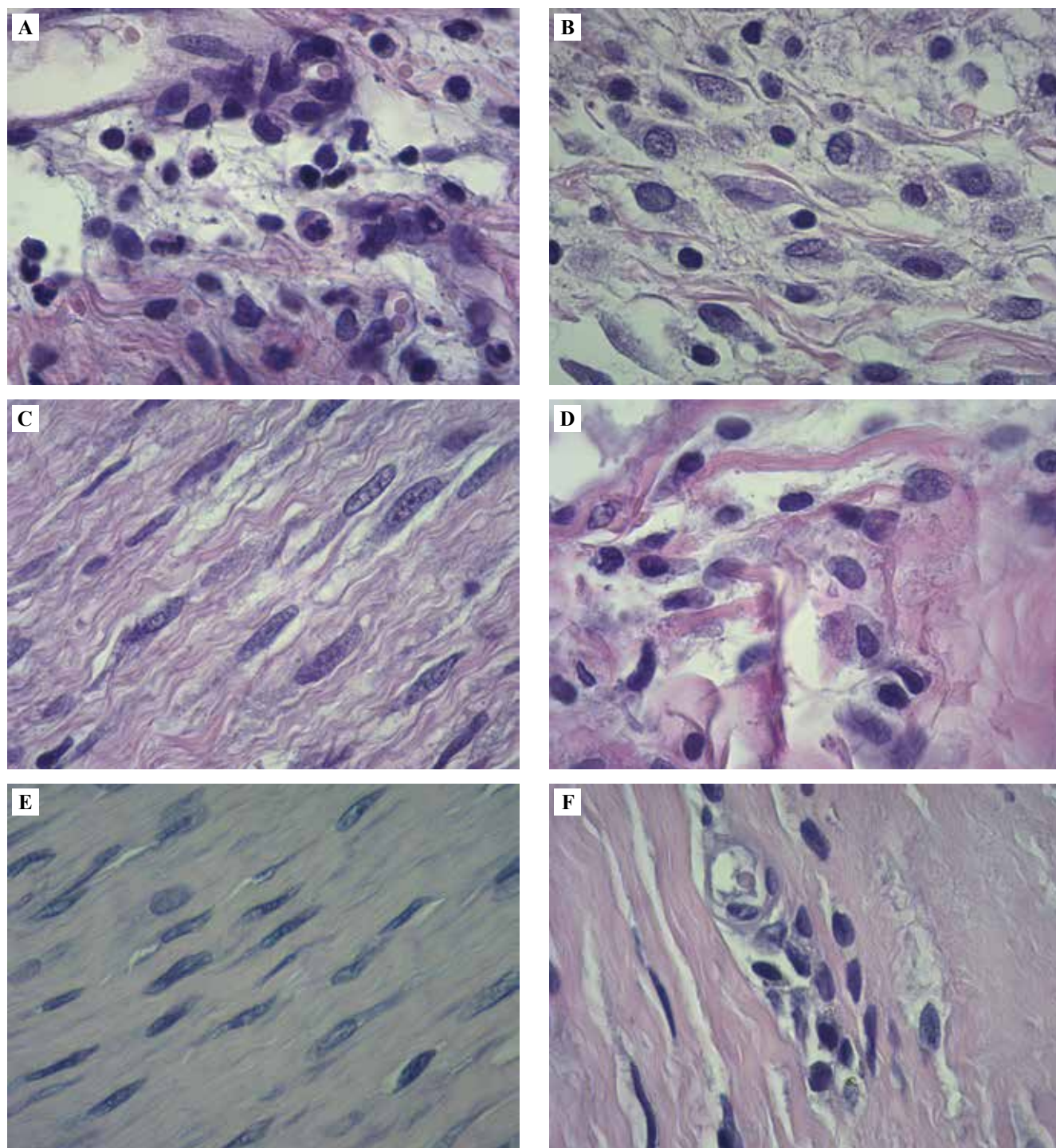


Рис. 1. Структура регенерата сухожилия в группе I.

А – 1 сутки: нейтрофильно-макрофагальный инфильтрат и отек в перитенонии; В – 7 суток: фибробласты, макрофаги и тонкие пучки коллагеновых волокон в ткани регенерата; С – 14 суток: пучки коллагеновых волокон волнистой конфигурации, между ними находятся фибробласты; D – 14 суток: очаг фибриноидного набухания с признаками макрофагальной резорбции; E – 60 суток: рубцовая ткань с многочисленными фиброцитами, плотно расположенные пучки коллагеновых волокон имеют волнистую или прямолинейную архитектуру; F – 60 суток: очаг макрофагальной резорбции детрита. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 1000$

Fig. 1. Tendon regenerate structure in Group I.

Structure of a tendon regenerate in Group I. A – day 1: infiltrate consisting of neutrophils and macrophages, edema in the peritendineum; B – day 7: fibroblasts, macrophages, and thin bundles of collagen fibers in the regenerate; C – day 14: wavy bundles of collagen fibers among fibroblasts; D – day 14: focus of fibrinoid swelling with signs of macrophage resorption; E – day 60: scar tissue with numerous fibrocytes, densely located bundles of collagen fibers with wavy or rectilinear architecture; F – day 60: macrophages resorbing the detritus. H&E stain.  $\times 1,000$



тивных изменений с признаками макрофагальной резорбции (рис. 1 D). Через 60 суток регенерат имел пучковое строение. В его структуре преобладали области с плотной упаковкой пучков коллагеновых волокон прямолинейной или волнистой архитектоники, богатые фиброцитами (рис. 1 E) и отличающиеся неодинаковым расположением (параллельное, косое), что характерно для рубцовых изменений сухожилия. Между пучками была расположена соединительная ткань с кровеносными сосудами капиллярного и венозного типа, имеющая признаки фиброза и содержащая умеренный макрофагально-лимфоцитарный инфильтрат. Наряду с этим в регенерате сохранялись очаги мукоидного и фибриноидного набухания с макрофагальной инфильтрацией (рис. 1 F). Примечательно, что в этот срок ткань регенерата становилась гиповаскулярной.

В группе II через 1 сутки инфильтрат был обильнее, чем в группе I. Обращает на себя внимание, что в эпителии и поверхностных слоях сухожилия он состоял из нейтрофилов и макрофагов, а в толще сухожилия главным образом из макрофагов и лимфоцитов (рис. 2 A). Это может указывать на локальное более раннее завершение нейтрофильной реакции и начало процесса резорбции детрита в толще сухожилия. Через 7 суток в структуре регенерата наблюдали оформленные пучки коллагеновых волокон, между которыми находилась межпучковая соединительная ткань; она содержала меньше адипоцитов по сравнению с образцами группы II. В очагах некроза среди деструктивно измененных волокон располагались крупные молодые фибробласты и гемокapилляры (рис. 2 B). При этом тонкие коллагеновые волокна регенерата располагались между «старых», предсуществующих пучков поврежденного сухожилия, что позволяет предположить возможность векторного

синтеза межклеточного вещества регенерата на основе исходных коллагеновых конструкций. Вне областей некроза регенерат содержал крупные отростчатые фибробласты и тонкие, хорошо структурированные пучки коллагеновых волокон со взаимопараллельным расположением.

Через 14 суток наблюдали регенерат, сформированный фиброзной тканью пучкового строения. Пучки коллагеновых волокон большей толщины, чем в контроле, отличались плотным расположением и выраженной волнистостью конфигурации. Между ними расположены крупные отростчатые фибробласты и фиброциты (рис. 2 C). Пучки коллагеновых волокон разделялись прослойками соединительной ткани с кровеносными сосудами и многочисленными сидерофагами (рис. 2 D). Они были тоньше, чем в контрольных образцах, и содержали лишь единичные адипоциты. Паравазально наблюдалась умеренная лимфоидно-макрофагальная инфильтрация. Через 60 суток регенерат сохранял пучковое строение. Пучки коллагеновых волокон толстые, прямой или волнистой конфигурации, располагались плотно и в основном взаимопараллельно (рис. 2 E). Между ними видны фиброциты, количество которых было меньше, чем в группе I. В то же время степень васкуляризации регенерата выше, чем в группе I. В толще регенерата встречались области с массовым апоптозом фиброцитов (рис. 2 F) и очаговой макрофагальной резорбцией, что наряду с умеренной макрофагальной инфильтрацией межпучковой соединительной ткани может свидетельствовать о ремоделировании регенерата, которое выражено в большей степени, чем в контроле. Динамика толщины регенерата и морфометрические показатели его ткани представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 | Table 1

Динамика толщины регенерата сухожилия (мкм), Me (Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>) | Tendon regenerate thickness over time (μm), Me (Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>)

Срок эксперимента   Experiment day	Группы   Groups		
	группа I   group I	группа II   group II	группа III (нормативные показатели), n=25   group III (reference range), n=25
7 суток   Day 7 n=10	1070 (1063; 1079)	1430* (1419; 1442)	725 (695; 734)
14 суток   Day 14 n=10	889 (878; 897)	1240* (1231; 1249)	
60 суток   Day 60 n=10	582 (572; 598)	743* (732; 756)	

\* Статистически значимые отличия группы II от группы I и группы III (p≤0,05) | Statistically significant differences between group II and groups I and III (p≤0.05)

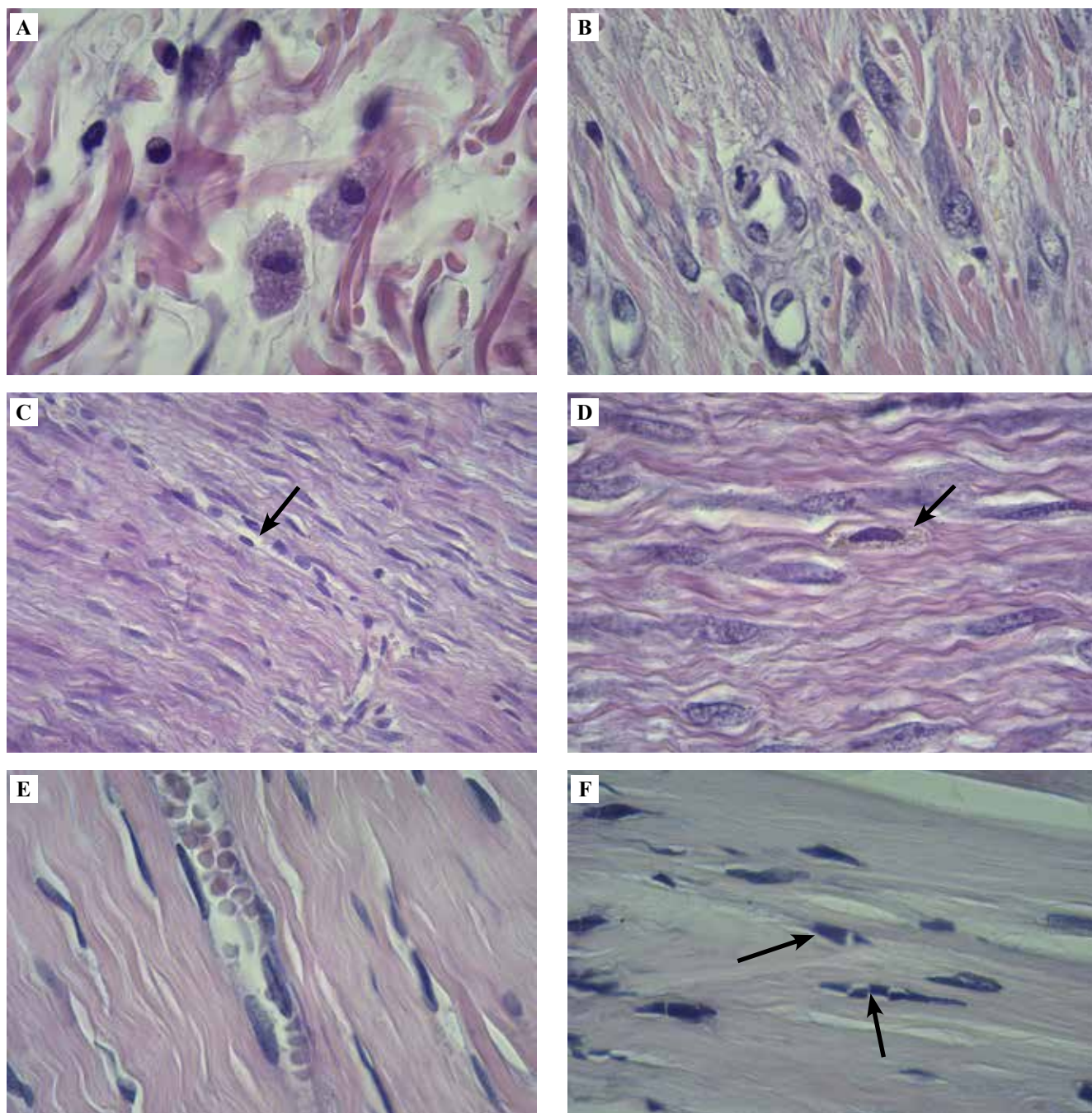


Рис. 2. Структура регенерата сухожилия в группе II.

А – 1 сутки: лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат и отек в перитенонии; В – 7 суток: кровеносные сосуды, макрофаги и крупные фибробласты находятся между «старыми» пучками коллагеновых волокон; С – 14 суток: пучки коллагеновых волокон плотно упакованы, имеют волнистую конфигурацию, среди них видны многочисленные фибробласты и гемокapилляр (стрелка); D – 14 суток: фиброциты и фибробласты фиброзной ткани среди пучков коллагеновых волокон, стрелкой показан сидерофаг; E – 60 суток: пучки коллагеновых волокон регенерата хорошо структурированы, волнистой конфигурации, плотно расположены, между ними находятся фиброциты, виден кровеносный сосуд венозного типа; F – 60 суток: область регенерата с многочисленными фиброцитами в состоянии апоптоза (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. А, В, D–F –  $\times 1000$ . С –  $\times 400$

Fig. 2. Tendon regenerate structure in Group II.

A – day 1: infiltrate consisting of lymphocytes and macrophages, edema in the peritendineum; B – day 7: blood vessels, macrophages, and large fibroblasts located between the “old” bundles of collagen fibers; C – day 14: the bundles of collagen fibers are tightly packed and of a wavy configuration, with numerous fibroblasts and blood capillaries being among the bundles (arrow); D – day 14: fibrocytes and fibroblasts among bundles of collagen fibers, a siderophage (arrow); E – day 60: well-structured and tightly located bundles of regenerate collagen fibers with wavy configuration, with fibrocytes being among them, a venous-type blood vessel in the center; F – day 60: regenerate region with numerous apoptotic fibrocytes (arrows). H&E stain. A, B, D–F –  $\times 1,000$ . C –  $\times 400$

Таблица 2 | Table 2

Сравнительная характеристика регенератов сухожилия по динамике показателей толщины пучков коллагеновых волокон первого и второго порядка (мкм), количества фибробластов и гемокapилляров (в поле зрения при  $\times 400$ ), Me (Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>) | Comparison of tendon regenerates with primary and secondary collagen fiber bundle thickness ( $\mu\text{m}$ ) and the number of fibroblasts and blood capillaries (in the field of view at  $\times 400$ ), Me (Q<sub>1</sub>÷Q<sub>3</sub>)

Срок эксперимента и группы   Experiment days	Показатели   Indicators			
	толщина пучков коллагеновых волокон первого порядка, мкм   Primary collagen fiber bundle thickness, $\mu\text{m}$	толщина пучков коллагеновых волокон второго порядка, мкм   Secondary collagen fiber bundle thickness, $\mu\text{m}$	количество фибробластов   Number of fibroblasts	количество гемокapилляров   Number of hemocapillaries
<b>7 суток   Day 7</b>				
Группа I, n=10   Group I, n=10	2,5 (2,2; 2,7)	Не организованы   Disorganized	47 (41; 52)	10 (9;12)
Группа II, n=10   Group II, n=10	2,3 (2,0; 2,5)	Не организованы   Disorganized	68* (65; 72)	11 (10;12)
<b>14 суток   Day 14</b>				
Группа I, n=10   Group I, n=10	4,8 (4,2; 5,0)	124 (110; 134)	70 (65; 74)	8 (7;10)
Группа II, n=10   Group II, n=10	4,1 (2,5; 4,3)	126 (112; 136)	52* (46; 55)	6 (4;8)
<b>60 суток   Day 60</b>				
Группа I, n=10   Group I, n=10	5,1 (4,8; 5,3)	172* (157; 181)	64 (58; 67)	3*(1;4)
Группа II, n=10   Group II, n=10	4,9 (4,8; 5,1)	123 (117; 131)	44* (40; 48)	6 (4;8)
Группа III (нормативные показатели), n=25   Group III (reference range), n=25	6,2 (5,9; 6,4)	106 (99; 109)	36 (34; 40)	6 (4;8)

\* Статистически значимые отличия группы II от группы I и группы III ( $p \leq 0,05$ ) | Statistically significant differences between group II and groups I and III ( $p \leq 0.5$ )

#### Результаты исследований методом трансмиссионной электронной микроскопии

В группе I через 1 сутки в области вмешательства наблюдали детрит и выраженный отек межклеточного вещества, в коллагеновых фибриллах были видны признаки фибриноидного набухания (рис. 3 А). Через 7 суток в области заживления на фоне сохранения отека и очагов фибриноидного набухания наблюдали активированные фибробласты и вновь образованные коллагеновые фибриллы неупорядоченной архитектоники (рис. 3 В). Через 14 суток в регенерате, богатом фибробластами, гистиоцитами и гемокapиллярами, часть

вновь сформированных коллагеновых фибрилл уже имела признаки фибриноидного набухания (рис. 3 С). Через 60 суток в ткани регенерата сохранялись признаки отека эндотенона, незначительный отек межфибриллярных пространств. Структура коллагеновых фибрилл была сохранена, они имели разнонаправленное расположение и плотную упаковку (рис. 3 D), что характерно для рубцовых изменений. Дистрофические изменения определяли лишь очагово.

В группе II через 1 сутки наблюдались неупорядоченное расположение поврежденных коллагеновых фибрилл, а также признаки умеренно выраженного

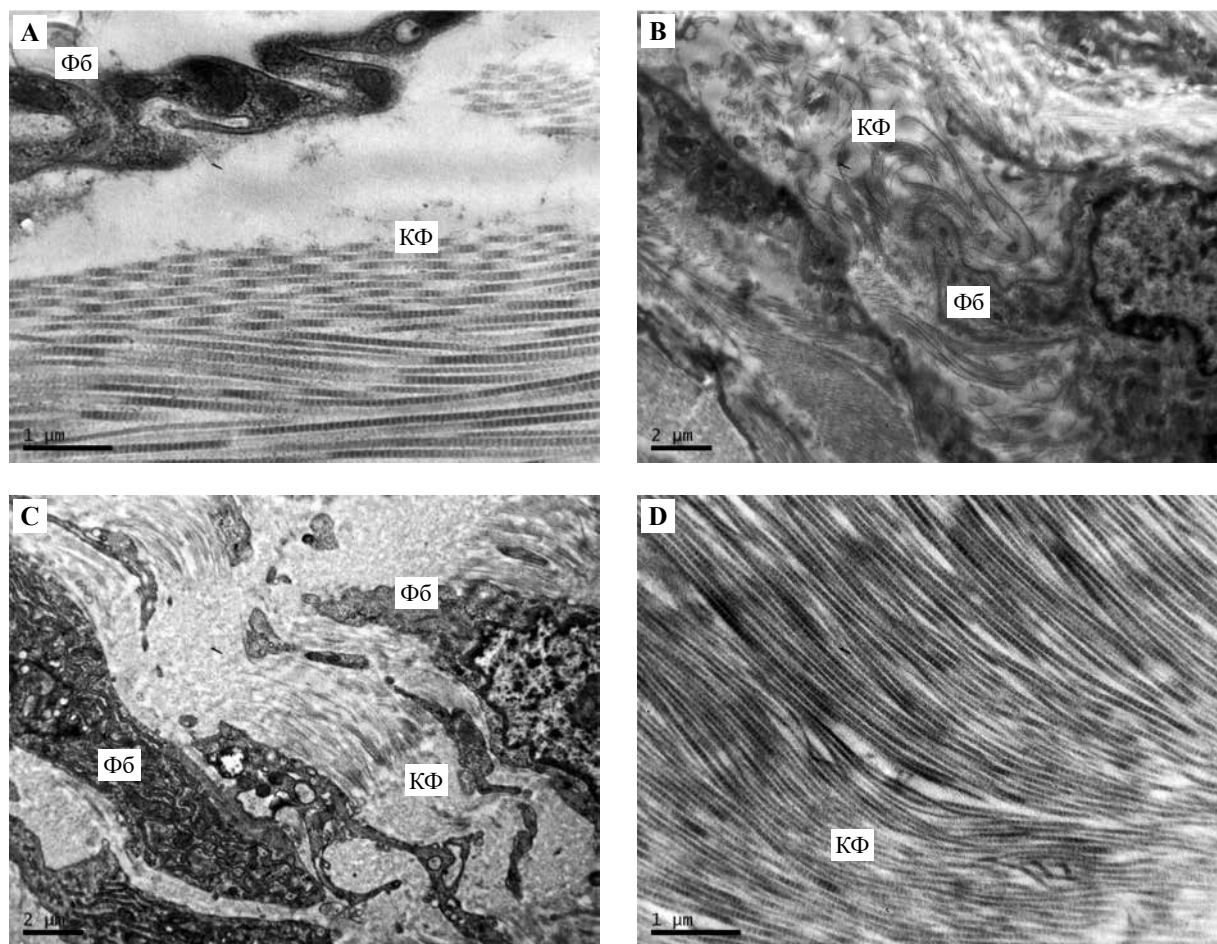


Рис. 3. Динамика ультраструктуры регенерата сухожилия в группе I.

А – 1 сутки: отек межклеточного вещества, многие коллагеновые фибриллы (КФ) не имеют поперечной исчерченности; В – 7 суток: фибробласт (Фб) и разнонаправленные, закрученные коллагеновые фибриллы (КФ) регенерата; С – 14 суток: фибробласты (Фб) имеют признаки высокой синтетической активности, между ними видны коллагеновые фибриллы; D – плотно расположенные коллагеновые фибриллы, видны признаки межфибриллярного отека. ТЭМ. А –  $\times 20\,000$ , В–D –  $\times 14\,000$

Fig. 3. Ultrastructure of the tendon regenerates in Group I over time.

А – day 1: swollen intercellular substance, many collagen fibrils (КФ) do not have transverse striation; В – day 7: fibroblast (Фб) and divergent whirled collagen fibrils (КФ) of the regenerate; С – day 14: fibroblasts (Фб) of high synthetic activity, with collagen fibrils (КФ) being among them; D – densely located collagen fibrils (КФ), interfibrillar edema. TEM, А –  $\times 20,000$ , В–D –  $\times 14,000$

мукоидного набухания основного вещества ткани (рис. 4 А), которое сохранялось на 7-е и 14-е сутки. Через 7 суток в ткани регенерата выявляли умеренную пролиферацию фибробластов. Синтезируемые ими коллагеновые фибриллы обладали типичной поперечной исчерченностью, имели взаимопараллельное расположение и волнистую конфигурацию (рис. 4 В), к 14-м суткам упорядоченность и плотность их расположения возрастали (рис. 4 С). Через 60 суток в регенерате отмечали волнистую деформацию коллагеновых фибрилл и формируемых ими волокон. Отек основного вещества и межфибриллярных пространств был умеренным и выраженным в меньшей степени, чем в группе I. При этом коллагеновые фибриллы имели типичную поперечную исчерченность, были хорошо структурированы и ориентированы взаимопараллельно (рис. 4 D).

#### Результаты микроморфометрических исследований

Результаты микроморфометрических исследований регенератов сухожилия представлены в таблицах 1 и 2.

При оценке межгрупповых отличий показано, что в процессе репарации статистически значимые различия толщины регенерата появлялись между группами I и II на 7-е сутки и сохранялись на всех сроках эксперимента. По данному показателю образцы группы II на 7-е, 14-е и 60-е сутки превосходили образцы группы II и были несколько больше, чем в группе III. Последний факт может быть связан с рубцовыми изменениями сухожилия и околосухожильных тканей.

По показателю толщины пучков коллагеновых волокон первого порядка статистически значимых отличий между группами I и II не имелось, однако на всех

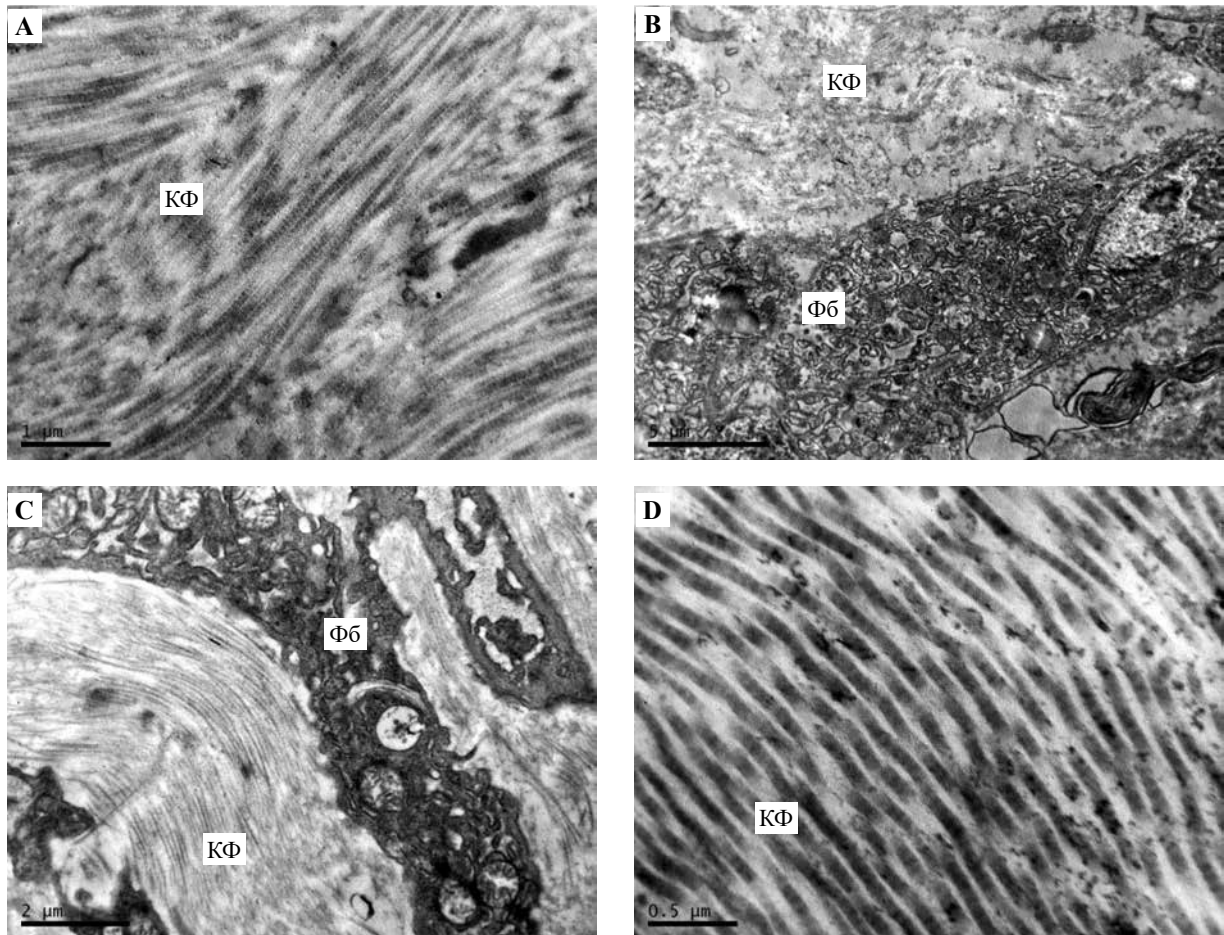


Рис. 4. Динамика ультраструктуры регенерата сухожилия в группе II.

А – 1 сутки: отек межклеточного вещества, поперечная исчерченность коллагеновых фибрилл (КФ) сохранена; В – 7 суток: незначительный отек межфибриллярного пространства, коллагеновые фибриллы (КФ) имеют волнистую конфигурацию, взаимопараллельное расположение и типичную поперечную исчерченность; С – 14 суток: коллагеновые фибриллы (КФ) хорошо структурированы, имеют упорядоченное расположение, рядом с ними виден фибробласт (Фб); D – плотно расположенные коллагеновые фибриллы (КФ) волнистой конфигурации, видны признаки межфибриллярного отека. ТЭМ. А –  $\times 20\,000$ , В –  $\times 8\,000$ , С –  $\times 14\,000$ , D –  $\times 40\,000$

Fig. 4. Ultrastructure of the tendon regenerates in Group II over time.

A – day 1: intercellular edema, preserved cross striation of the collagen fibrils (КФ); B – day 7: minor swelling of the interfibrillar space, parallel to each other collagen fibrils (КФ) with a wavy configuration, and a typical cross striation; C – day 14: well-structured collagen fibrils (КФ) with an ordered arrangement, fibroblast (Фб) is next to them; D – densely located collagen fibrils (КФ) with wavy configuration, interfibrillar edema. TEM. A –  $\times 20,000$ , B –  $\times 8,000$ , C –  $\times 14,000$ , D –  $\times 40,000$

сроках эксперимента этот показатель уступал таковому в группе III, не достигая контрольных значений даже на 60-е сутки опыта. По показателю толщины пучков коллагеновых волокон второго порядка различия между группами I и II на 14-е сутки не установлены, но по этому показателю обе группы превосходили группу III. На 60-е сутки в группе I толщина пучков коллагеновых волокон второго порядка еще более возрастала, в группе II оставалась без изменений, но в обеих группах значения этого показателя превосходили таковые в группе III. Это может быть связано с рубцовыми изменениями, выраженными в большей степени в группе I. Количество фибробластов в ткани регенерата имело статистически значимые отличия между группами на всех сроках эксперимента, при этом в группах I и II оно было

больше, чем в группе III, и не достигало нормальных значений к 60-м суткам. При этом на 7-е сутки образцы группы II превосходили образцы группы I по данному показателю, а на 14-е и 60-е сутки уступали им. Такая картина может быть связана с ранним усилением пролиферативной и синтетической активности клеток фибробластического дифферона, а затем с более ранним началом ремоделирования в результате действия секрета. По показателю количества гемокapилляров статистически значимые отличия установлены между группами I и II на 60-е сутки эксперимента: в эти сроки опытные образцы не только превосходят контрольные, но и соответствуют нормальным значениям, что указывает на лучшее кровоснабжение ткани регенерата, сформированного под влиянием секрета МСК.

## Обсуждение

Ряд авторов сообщает о положительных результатах лечения тендинитов при использовании стромально-васкулярной фракции и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [7–17], которые обладают способностью стимулировать собственные прогениторные клетки ткани сухожилия, уменьшают выраженность экссудации и стимулируют формирование регенерата с упорядоченным расположением пучков коллагеновых волокон. Применяются и сами прогениторные клетки сухожилий, получаемые из эндотенония и перитенония [7], используется методика 3D культивирования клеток на трехмерных матрицах [12]. Тем не менее в этих исследованиях недостаточно полно осуществлен морфологический контроль, а результаты не всегда стандартны, что не позволяет выработать протокол применения клеточных продуктов в клинической практике.

Проведенное нами исследование влияния секрета МСК на течение репаративной регенерации сухожилия показало, что под влиянием секрета с первых суток после травмы и на всем протяжении эксперимента воспалительный отек и деструктивные изменения ткани выражены в меньшей степени, чем в контроле. На ультраструктурном уровне установлено, что в опытной группе в отличие от контрольной отсутствовали признаки фибриноидного набухания и выраженных некротических изменений, что, на наш взгляд, представляется важным фактором полноценного заживления. При самостоятельном заживлении именно эти очаги дистрофии являются одной из причин хронизации тендинитов и их перманентного рецидивирования. Резорбция детрита происходит раньше, как и формирование регенерата пучкового строения: оно отмечено уже на 7-е сутки эксперимента, тогда как в контроле наблюдается на 14-е сутки. В ткани регенерата в опытной группе на 7-е сутки пучки коллагеновых волокон были лучше структурированы и приобрели взаимопараллельное расположение, в то время как в контроле они оказались не только тоньше, но и перемежались в структуре регенерата с белой жировой тканью. В дальнейшем с 14-х суток отмечались признаки ремоделирования регенерата: апоптоз фиброцитов и фибробластов, который выражен в большей степени, чем в контрольных образцах, макрофагальная инфильтрация регенерата, изменение фиброархитектоники. К 60-м суткам в опытных образцах наблюдались уплотнение расположения и утолщение пучков коллагеновых волокон при их взаимопараллельном расположении, уменьшение количества фибробластов при нормализации васкуляризации. В контрольных образцах отмечали как взаимопараллельное, так и разнонаправленное расположение пучков коллагеновых волокон в фиброзной ткани регенерата, не соответствующее биомеханической оси конечности. Наряду с уменьшением общей толщины регенерата этот фактор, несомненно, обуславливает снижение прочностных и упруго-деформативных характеристик сухожилия, что является морфологической

основой для его повторных травм. Кроме того, ткань регенерата в контрольных образцах была гиповаскулярной, при этом в ней сохранялось большое количество фиброцитов и фибробластов, что в дальнейшем может усугубить рубцовые изменения ткани сухожилия. Можно полагать, что в опытной группе более раннее ремоделирование регенерата, его структурированность и нормализация васкуляризации обусловлены действием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в секрете МСК, а также факторов роста, в частности фактора роста эндотелия.

## Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в условиях применения секрета мезенхимальных стромальных клеток репаративная регенерация сухожилия протекает, в отличие от контроля, на фоне менее выраженных воспалительного отека, трофических нарушений и дистрофических и некротических изменений. Ремоделирование регенерата начинается раньше, чем в контроле, причем он приобретает свойственное сухожилию пучковое строение. Наряду с меньшей выраженностью рубцовых изменений и нормализацией васкуляризации это может быть залогом формирования полноценного в структурном и функциональном отношении регенерата.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

Сбор и обработка материала – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

Написание текста – Е.Н. Борхунова, М.Д. Качалин.

Редактирование – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

Collected the data and performed the analysis – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

Wrote the paper – E.N. Borkhunova, M.D. Kachalin.

Edited the manuscript – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

**Конфликт интересов.** Андрей Игоревич Довгий – генеральный директор ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** Andrew I. Dovgii – General Director, LLC “T-Helper Cell Technologies”. Other authors declare that they have no competing interests.

## Литература/References

1. Борхунова Е.Н. Морфологические изменения в ткани сухожилия поверхностного сгибателя пальца у лошадей при тендинитах. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2021;3:6–13. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103001.

- Borkhunova E.N.* Morphological changes in the tendon tissue of the superficial flexor of the finger in horses with tendinitis. *Veterinary Medicine, Zootechnics and Biotechnology*. 2021;3:6–13 (In Russ.). DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103001.
2. *Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowsky LJ.* Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res*. 2015;33(6):780–4. DOI: 10.1016/j.surg.2017.04.004.
  3. *D'Addona A, Maffulli N, Formisano S, Rosa D.* Inflammation in tendinopathy. *Surgeon*. 2017;15(5): 297–302. DOI: 10.1016/j.surg.2017.04.004.
  4. *Samora JB, Klinefelter RD.* Flexor tendon reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg*. 2016;24(1):28–36. DOI: 10.5435/JAAOS-D-14-00195.
  5. *Пономаренко Н.С., Куклин И.А., Монастырев В.В., Михайлов И.Н., Рудаков А.Н., Бубнов А.С. и др.* Сравнение результатов хирургического лечения пациентов с повреждением пяточного сухожилия при диастазе II и III степени по Myerson с использованием сухожилия подошвенной мышцы. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018;3(3):170–175. DOI: 10.29413/ABS.2018-3.3.32.  
*Ponomarenko NS, Kuklin IA, Monastirev VV, Mikhaylov IN, Rudakov AN, Bubnov AS et al.* Comparison of the results of surgical treatment of patients with Achilles tendon injury at Myerson stage II and III diastasis using plantar muscle flexor tendon. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018;3(3):170–175 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2018-3.3.32.
  6. *Gillespie RJ, Knapik DM, Akkus O.* Biologic and synthetic grafts in the reconstruction of large to massive rotator cuff tears. *J Am Acad Orthop Surg*. 2016;24(12): 823–8. DOI: 10.5435/JAAOS-D-15-00229.
  7. *Walia B, Huang AH.* Tendon stem progenitor cells: Understanding the biology to inform therapeutic strategies for tendon repair. *J Orthop Res*. 2019;37(6):1270–80. DOI: 10.1002/jor.24156.
  8. *Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME.* Mesenchymal stem cells empowering tendon regenerative therapies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):3002. DOI: 10.3390/ijms20123002.
  9. *Schneider M, Angele P, Järvinen TAH, Docheva D.* Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:352–75. DOI: 10.1016/j.addr.2017.12.016.
  10. *Al-Ani MKh, Xu K, Sun Y, Pan L, Xu Z, Yang L.* Study of bone marrow mesenchymal and tendon-derived stem cells transplantation on the regenerating effect of Achilles tendon ruptures in rats. *Stem Cells Int*. 2015;2015:984146. DOI: 10.1155/2015/984146.
  11. *MacLean S, Khan WS, Malik AA, Snow M, Anand S.* Tendon regeneration and repair with stem cells. *Stem Cells Int*. 2012;2012:316281. DOI: 10.1155/2012/316281.
  12. *Дремнина Н.Н., Трухан И.С., Шурыгина И.А.* Клеточные технологии в травматологии: от клетки до клеточной инженерии. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(6):66–76. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.8.  
*Dremnina NN, Trukhan IS, Shurygina IA.* Cellular Technologies in Traumatology: from Cells to Tissue Engineering. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(6):66–76 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.8.
  13. *Dyment NA, Hagiwara Y, Matthews BG, Li Y, Kalajzic I, Rowe DW.* Lineage tracing of resident tendon progenitor cells during growth and natural healing. *PLoS One*. 2014;9(4):e96113. DOI: 10.1371/journal.pone.0096113.
  14. *Ni M, Rui YF, Tan Q, Liu Y, Xu LL, Chan KM et al.* Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials*. 2013;34(8): 2024–37. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.046.
  15. *Zhang C, Zhang E, Yang L, Tu W, Lin J, Yuan C et al.* Histone deacetylase inhibitor treated cell sheet from mouse tendon stem/progenitor cells promotes tendon repair. *Biomaterials*. 2018;172:66–82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.043.
  16. *de Lima Santos A, Silva CGD, de Sá Barretto LS, Franciozi CEDS, Tamaoki MJS, de Almeida FG et al.* Biomechanical evaluation of tendon regeneration with adipose-derived stem cell. *J Orthop Res*. 2019;37(6):1281–6. DOI: 10.1002/jor.24182.
  17. *Augustyniak J, Bertero A, Coccini T, Baderna D, Buzanska L, Caloni F.* Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies. *J Appl Toxicol*. 2019;39(12):1610–22. DOI: 10.1002/jat.3815.
  18. *Makarevich PI, Efimenko AYU, Tkachuk VA.* Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: Basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(1):11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022.
  19. *Полябин С.В., Борхунова Е.Н., Сароян С.В., Комаров С.В., Довгий А.И.* Инновационные методы регенеративной медицины при лечении собак и кошек с язвенными кератитами: Учебное пособие. Москва: ЗооВетКнига, 2022. 138 с. DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-8.  
*Pozlyabin SV, Borkhunova EN, Saroyan SV, Komarov SV, Dovgiy AI.* Innovative methods of regenerative medicine in the treatment of dogs and cats with ulcerative keratitis: Textbook. Moscow: ZooVet-Kniga, 2022. 138 p. (In Russ.). DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-8.
  20. *А.А. Соколов, А.И. Довгий, А.И. Колесникова.* Материал стволовых клеток и способ его получения. Патент Российской Федерации 2644650. Заявитель и патентообладатель ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии» – № 2014148251. Заявлено 01.12.2014; опубликовано 27.06.2016. Бюллетень № 18. AA Sokolov, AI Dovgiy, AI Kolesnikova. Stem cell material and method for its production. Patent № 2644650 Russian Federation. Applicant and patent holder LLC “T-Helper Cellular Technologies” – No. 2014148251. Application 12.01.2014; published 06/27/2016. Bulletin No.18.

### Информация об авторах

Михаил Дмитриевич Качалин – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Елена Николаевна Борхунова – доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климova Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Сергей Владимирович Позябин – доктор ветеринарных наук, профессор, ректор, заведующий кафедрой ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Людмила Михайловна Михалева – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Давид Александрович Арешидзе – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Мария Александровна Козлова – научный сотрудник лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Андрей Игоревич Довгий – кандидат биологических наук, генеральный директор ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии».

#### Author information

Mikhail D. Kachalin – Cand. Sci. (Vet.), Associate Professor, Department Veterinary Surgery, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0001-5942-8771>

Elena N. Borkhunova – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Animal Anatomy and Histology, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0003-2355-8616>

Sergey V. Pozyabin – Dr. Sci. (Vet.), Professor, Rector of the Academy, Head of the Department of Veterinary Surgery, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0002-3825-6082>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

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

David A. Areshidze – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

Maria A. Kozlova – Researcher, Laboratory of Cell Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-6251-2560>

Andrew I. Dovgii – Cand. Sci. (Biol.), General Director, LLC “T-Helper Cell Technologies”.

<https://orcid.org/0000-0001-9510-7078>



## Рецензия на монографию «Патологоанатом: он кто?»

**Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов**  
Москва: СИМК, 2022. – 112 с.

“Pathologists: who are they?”

A monograph review

**Evgeny F. Lushnikov,  
Aleksandr Yu. Abrosimov**

В небольшом по объему издании освещаются все разделы работы патологоанатома: исследование биопсийного и операционного материала, то есть прижизненные морфологические исследования при различных заболеваниях, аутопсийный раздел, научная и педагогическая деятельность, возможности постановки эксперимента на животных. Зачастую различные виды деятельности осуществляет один специалист.

Монография состоит из следующих разделов: предисловие, главы I, II, III, IV, послесловие. В предисловии дается определение специальности «патологическая анатомия» и раскрываются ее параметры. Авторы совершенно справедливо указывают, что «беда не в том, что многие обыватели не знают о патологоанатоме и особенностях его деятельности, плохо то, что даже некоторые врачи “забыли”, чему их учили на кафедре патологической анатомии медицинского университета».

Глава I посвящена врачу-патологоанатому, в ней дается описание основных видов деятельности, выполняемых патологоанатомом, а также факторов, влияющих на результаты его работы.

В главе II «Человек – объект патологоанатома» раскрываются уровни исследования: организменный, органнй, тканевой, клеточный, субклеточный, молекулярный.

В главе III «Инструменты патологоанатома» показаны современные новые возможности в работе этого специалиста, особенное значение приобретают цифровизация и телемедицина. Помимо материальных средств патологоанатом должен владеть идеальными инструментами – понятиями и терминами, такими как жизнь, здоровье, болезнь, смерть, определения которых, включая философские аспекты, уделяется большое внимание.

В главе IV «Деятельность патологоанатома» подробно описаны все виды работ, которую он выполняет: прижизненная диагностика, посмертные исследова-

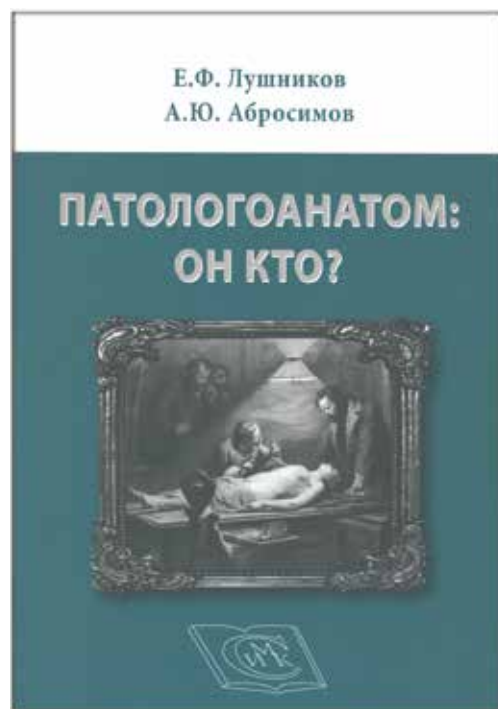
ния, научная и педагогическая деятельность. Каждый из разделов сопровождается примерами из практики авторов, что делает описание занимательным.

Заканчивается монография послесловием, в котором дается ответ на вопрос, поставленный в ее названии. Подчеркивается, что патологоанатом является одной из ведущих фигур в клинической и фундаментальной медицине. Подводя итоги, авторы делают вывод, что патологоанатом – врач с широким кругозором, активный участник диагностического и лечебного медицинского процесса. Он работает для сохранения самого ценного у человека – его жизни в здоровом состоянии.

Несомненно, издание, которое базируется на личном опыте ведущих отечественных специалистов, будет полезно молодым врачам, ординаторам, аспирантам, клиницистам, работающим в тесном контакте с патологоанатомами.

*Е.М. Непомнящая,  
доктор медицинских наук, профессор,  
врач-патологоанатом отделения патологической  
анатомии  
НМИЦ онкологии Минздрава России*

*А.В. Шапошников,  
доктор медицинских наук, профессор,  
руководитель отделения превентивной онкологии  
НМИЦ онкологии Минздрава России*



**Рецензия на учебник  
«Pathological Anatomy».  
Под редакцией В.С. Паукова  
Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 752 с.**

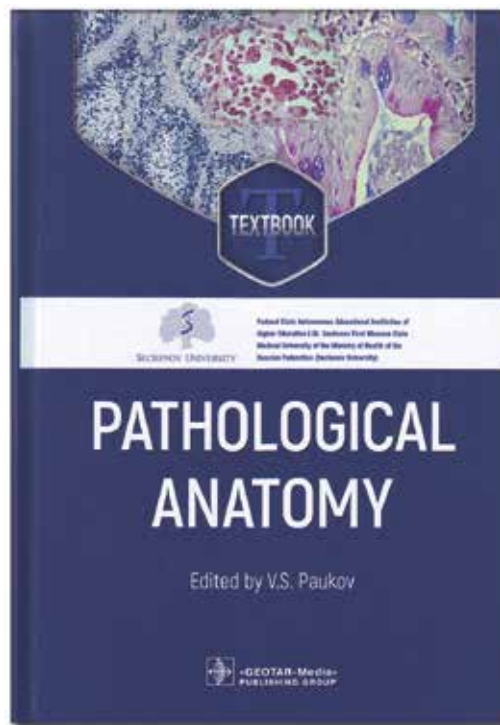
**“Anatomic Pathology.”  
A textbook review  
Edited by Vyacheslav S. Paukov**

Издательство «ГЭОТАР-Медиа» выпустило первый в России оригинальный учебник по патологической анатомии на английском языке «Pathological Anatomy» под редакцией профессора В.С. Паукова. Учебник создан ведущими преподавателями Института клинической морфологии и цифровой медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) при участии профессоров ряда других вузов страны.

Необходимость создания такого учебника объясняется тем, что во многих медицинских высших учебных заведениях России обучаются студенты и аспиранты из разных стран Европы, Азии, Африки и Латинской Америки, говорящие на английском языке. Им бывает трудно использовать русскоязычные учебные пособия, поэтому в большинстве вузов преподавание патологической анатомии ведется на английском языке с помощью учебников иностранных авторов, в которых изложение материала далеко не во всем совпадает с нашими принципами обучения этой специальности.

Зарубежные издания, в частности «Robbins Basic Pathology» (серия Robbins Pathology) издательства Elsevier, подчас перегружены сведениями, необходимыми ординаторам и аспирантам, уже профессионально занимающимся патологической анатомией, но не студентам, большинство из которых не станет патологоанатомами. Отечественная же школа ориентирована на будущих врачей общей практики, которые должны знать, что такое болезнь, понимать закономерности развития патологических процессов и структурных изменений, лежащих в основе заболевания. Кроме того, одна из задач российских медицинских высших учебных заведений заключается в том, чтобы иностранные студенты знали особенности отечественной школы патологической анатомии, отличительной чертой которой является клинко-морфологическое направление, а изучение патологических изменений основано на принципе сопряжения и единства структуры и функции, не всегда используемом при обучении в зарубежных вузах. Создание отечественного учебника патологической анатомии на английском языке – давно назревшая проблема.

«Pathological Anatomy» рассчитан на учащихся лечебных, педиатрических и стоматологических факультетов. В издании содержится более 200 оригиналь-



ных рисунков и таблиц. Построено оно по традиционному для отечественных учебников плану, имеет разделы по общей и частной патологической анатомии. Материал изложен с учетом современных данных об этиологии, патогенезе, морфологии, классификациях заболеваний; морфологические изменения сопоставляются с клиническими проявлениями патологических процессов и болезней. Специальная глава посвящена объяснению понятия «нозология» и правилам формулирования диагноза.

При изложении материалов учебника учтены требования федеральных государственных образовательных стандартов. Издание рекомендовано координационным советом в области высшего образования «Здравоохранение и медицинские науки» к использованию в образовательных учреждениях, реализующих профессиональные образовательные программы высшего образования уровня специалитета по направлениям подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия» и 31.05.03 «Стоматология». Учебник «Pathological Anatomy» будет полезен ординаторам и аспирантам, а также начинающим ассистентам. И безусловно, первый в России учебник по патологической анатомии, изданный на английском языке, представляет интерес для преподавателей медицинских образовательных учреждений, работающих с англоязычными студентами и ординаторами.

*А.В. Берестова,  
кандидат медицинских наук,  
доцент Института клинической  
морфологии и цифровой патологии  
Сеченовского университета*