

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 12 | № 3 | 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

*Баринова 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 **3** | 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>К.С. Масленкина, Л.М. Михалева, Е.Н. Мотылев,<br/>М.Ю. Гущин, В.О. Кайбышева, Д.А. Атыкшин,<br/>Я.Ю. Кудрявцева, Г.Ю. Кудрявцев<br/>Клинико-морфологическая диагностика<br/>эозинофильного эзофагита</p> | 5 | <p><i>K.S. Maslenkina, L.M. Mikhaleva, E.N. Motylev,<br/>M.U. Gushchin, V.O. Kaibysheva, D.A. Atyakshin,<br/>Y.Y. Kudryavtseva, G.Y. Kudryavtsev</i><br/>Clinical and morphological diagnosis of eosinophilic<br/>esophagitis</p> |
|---|---|---|

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ORIGINAL RESEARCH

- |   |    |  |
|---|----|--|
| <p>А.С. Тertychnyy, М.В. Мнихович,<br/>Д.П. Нагорная, П.В. Павлов, А.П. Кирюхин,<br/>А.А. Федоренко, А.А. Саха<br/>Нейроэндокринные опухоли желудка у пациентов<br/>с аутоиммунным гастритом</p>  | 19 | <p><i>A.S. Tertychnyy, M.V. Mnikhovich,<br/>D.P. Nagornaya, P.V. Pavlov, A.P. Kiryukhin,<br/>A.A. Fedorenko, A.A. Sakha</i><br/>Gastric neuroendocrine tumors in patients with<br/>autoimmune gastritis</p>  |
| <p>А.Ю. Калинчук, Л.А. Таширева,<br/>В.М. Перельмутер<br/>Фенотипическое разнообразие М1 и М2<br/>макрофагов микроокружения опухоли<br/>у пациенток с раком молочной железы:<br/>ассоциация с клинико-патологическими<br/>параметрами</p>                                       | 28 | <p><i>A.Yu. Kalinchuk, L.A. Tashireva,<br/>V.M. Perelmuter</i><br/>M1 and M2 macrophage phenotypic diversity<br/>in the tumor microenvironment in breast cancer<br/>patients: association with clinical and pathological<br/>parameters</p>  |
| <p>Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Пустовалов,<br/>С.А. Абрамова, Н.Г. Плехова, А.И. Симакова,<br/>С.А. Сокотун, А.О. Михайлов, И.Н. Ляпун,<br/>М.Ю. Щелканов<br/>Морфология лейкоцитов периферической крови<br/>у пациентов с новой коронавирусной инфекцией<br/>(COVID-19)</p> | 41 | <p><i>L.M. Somova, E.I. Drobot, E.V. Pustovalov,<br/>S.A. Abramova, N.G. Plekhova, A.I. Simakova,<br/>S.A. Sokotun, A.O. Mikhailov, I.N. Lyapun,<br/>M.Yu. Shchelkanov</i><br/>Morphology of peripheral blood leukocytes in patients<br/>with new coronavirus infection (COVID-19)</p> |

*А.С. Харламова, Е.Г. Отлыга, О.С. Годовалова,  
О.А. Юнеман, С.В. Савельев*  
Профили астроцитарной дифференцировки  
переднего мозга человека  
на внутриутробном этапе онтогенеза

50 *A.S. Kharlamova, E.G. Otlyga, O.S. Godovalova,  
O.A. Junemann, S.V. Saveliev*  
Astrocyte lineage differentiation profiles of the fetal  
human telencephalon

*Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, О.А. Карнюшко,  
В.Ф. Лазарев, С.М. Зиматкин, М.А. Носович,  
К.А. Храповицкая*  
Содержание нейроглобина в нейронах теменной  
коры и гиппокампа крыс с церебральной ишемией  
различной степени тяжести

64 *E.I. Bon, N.E. Maksimovich, O.A. Karnyushko,  
V.F. Lazarev, S.M. Zimatkin, M.A. Nosovich,  
K.A. Khrapovitskaya*  
The content of neuroglobin in neurons of the parietal  
cortex and hippocampus of rats with cerebral ischemia  
of varying severity

*М.Н. Михайлова, О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко,  
Л.М. Меркулова, И.С. Стоменская, О.Ю. Кострова*  
Реакция нейроэндокринных клеток и макрофагов  
селезенки на развитие опухоли в толстой кишке

72 *M.N. Mikhailova, O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko,  
L.M. Merkulova, I.S. Stomenskaya, O.Yu. Kostrova*  
Response of neuroendocrine cells and splenic  
macrophages to tumor development in the colon

*Н.А. Золотова, Д.Ш. Джалилова, И.С. Цветков,  
А.В. Сентябрева, О.В. Макарова*  
Морфологическая характеристика внутренних  
органов мышей при длительном потреблении  
микропластика

82 *N.A. Zolotova, D.Sh. Dzhaililova, I.S. Tsvetkov,  
A.V. Sentyabreva, O.V. Makarova*  
Morphological features of the internal organs in mice  
after prolonged microplastics consumption

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ SPECIAL DAYS AND TRIBUTES

К 100-летию со дня рождения  
Владимира Аркадьевича Шахламова  
(1923–2005)

93 To Vladimir A. Shakhlov's  
100th anniversary  
(1923–2005)

## Клинико-морфологическая диагностика эозинофильного эзофагита

*К.С. Масленкина<sup>1</sup>, Л.М. Михалева<sup>1</sup>, Е.Н. Мотылев<sup>1</sup>, М.Ю. Гущин<sup>1</sup>,  
В.О. Кайбышева<sup>2</sup>, Д.А. Атякшин<sup>3</sup>, Я.Ю. Кудрявцева<sup>3</sup>, Г.Ю. Кудрявцев<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

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

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

**Резюме.** Эозинофильный эзофагит (ЭоЭ) – иммуноопосредованное заболевание пищевода, которое проявляется дисфагией и болюсной обструкцией пищей и при патоморфологическом исследовании характеризуется преимущественно эозинофильной интраэпителиальной инфильтрацией. Цель обзора – изучить клинико-морфологические особенности ЭоЭ в аспекте дифференциальной диагностики с другими заболеваниями пищевода. Спектр таких заболеваний многогранен, включая гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (ГЭРБ), воспалительные заболевания кишечника, группу аутоиммунных заболеваний, а также редкие заболевания пищевода. Клиническая картина дисфагии и болюсной обструкции пищевода, а также эндоскопические признаки EREFS (Endoscopic Reference Score) характерны для ЭоЭ. При этом многочисленные исследования показали, что эозинофилия слизистой оболочки, обнаруживаемая при патоморфологическом исследовании, является неспецифическим признаком поражения пищевода и недостаточна для диагностики ЭоЭ. В связи с этим разработана морфологическая шкала оценки эозинофильного эзофагита (Eosinophilic Esophagitis Histological Scoring System, EoEHSS), которая включает оценку выраженности интраэпителиальной инфильтрации эозинофилами, базальноклеточной гиперплазии, эозинофильных абсцессов, поверхностного наслоения эозинофилов, расширения межклеточных пространств, повреждения поверхностного эпителия, дискератоза и фиброза собственной пластинки слизистой оболочки пищевода. Комплексная оценка клинических, эндоскопических и патоморфологических признаков позволяет точно диагностировать ЭоЭ и другие причины эозинофилии пищевода.

**Ключевые слова:** эозинофильный эзофагит, эозинофилия пищевода, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, целиакия, воспалительные болезни кишечника, ахалазия пищевода, атопия

**Для корреспонденции:** Людмила Михайловна Михалева. E-mail: mikhalevalm@yandex.ru

**Для цитирования:** Масленкина К.С., Михалева Л.М., Мотылев Е.Н., Гущин М.Ю., Кайбышева В.О., Атякшин Д.А., Кудрявцева Я.Ю., Кудрявцев Г.Ю. Клинико-морфологическая диагностика эозинофильного эзофагита. Клини. эксп. морфология. 2023;12(3):5–18. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.5-18.

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

**Статья поступила** 03.04.2023. **Получена после рецензирования** 18.04.2023. **Принята в печать** 20.06.2023.

## Clinical and morphological diagnosis of eosinophilic esophagitis

*K.S. Maslenkina<sup>1</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>1</sup>, E.N. Motylev<sup>1</sup>, M.U. Gushchin<sup>1</sup>,  
V.O. Kaibysheva<sup>2</sup>, D.A. Atyakshin, Y.Y. Kudryavtseva<sup>3</sup>, G.Y. Kudryavtsev<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

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

<sup>3</sup>Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, Russia

**Abstract.** Eosinophilic esophagitis (EoE) is an immune-mediated disease that presents with dysphagia and esophageal bolus obstruction and is characterized by predominant intraepithelial eosinophilic infiltration at histology. The aim of our literature review was to delineate clinical and morphological EoE features in terms of differential diagnosis with other esophageal diseases, i.e., gastroesophageal reflux disease (GERD), inflammatory bowel diseases (IBDs), autoimmune diseases, and rare esophageal disorders. Clinical features of dysphagia and esophageal bolus obstruction and endoscopic criteria (according to EREFS) are typical of EoE. Nevertheless, eosinophilia of the esophageal mucosa is not a specific marker of mucosal injury and is not sufficient for EoE diagnosis. Therefore, eosinophilic esophagitis histological scoring system (EoEHSS)

was developed. It involves assessment of intraepithelial eosinophilic infiltration, basal zone hyperplasia, eosinophilic abscesses, eosinophil surface layering, dilated intercellular spaces, surface epithelial alteration, dyskeratotic epithelial cells, and lamina propria fibrosis. Complex clinical, endoscopic, and histological evaluation allows accurate diagnosis of EoE and other causal factors of esophageal eosinophilia.

**Keywords:** eosinophilic esophagitis, esophageal eosinophilia, gastroesophageal reflux disease, celiac disease, inflammatory bowel diseases, achalasia, atopy

**Corresponding author:** Liudmila M. Mikhaleva. E-mail: mikhalevalm@yandex.ru

**For citation:** Maslenkina K.S., Mikhaleva L.M., Motylev E.N., Gushchin M.U., Kaibysheva V.O., Atyakshin D.A., Kudryavtseva Y.Y., Kudryavtsev G.Y. Clinical and morphological diagnosis of eosinophilic esophagitis. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):5–18 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.5-18.

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

**Received** 03.04.2023. **Received in revised form** 18.04.2023. **Accepted** 20.06.2023.

## Введение

Эозинофильный эзофагит (ЭоЭ) – это хроническое заболевание, проявляющееся нарушением глотания и прохождения пищи по пищеводу, обусловленное развитием иммуноопосредованного или антигенопосредованного воспаления слизистой оболочки пищевода с преобладанием эозинофильной инфильтрации, зачастую при наличии у пациентов atopического заболевания – бронхиальной астмы, atopического дерматита, ринита и др. [1–6]. По разным оценкам, аллергические заболевания являются фоном для развития ЭоЭ у 42–93% взрослых пациентов и 50–60% детей с ЭоЭ [7]. В частности, бронхиальная астма выявлена у 30–50%, а аллергический ринит – у 50–75% детей с ЭоЭ [8, 9].

Заболевание часто диагностируют у детей и молодых взрослых. Заболеваемость ЭоЭ совершает резкий подъем в возрастной группе 18–29 лет и выходит на плато у пациентов в возрасте от 30 до 49 лет с последующим стремительным убыванием выявляемости у пациентов старше 50 лет [10]. ЭоЭ преимущественно встречается у мужчин, которые составляют 75%. Клинические симптомы ЭоЭ неспецифичны. Наиболее характерна дисфагия, обуславливающая изменение пищевого поведения пациентов, – медленное пережевывание, отказ от твердой пищи, обильное запивание пищи водой и т.д. [6, 11, 12]. Также наблюдаются частая изжога и регургитация – симптомы, которые характерны для гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) [13], вызывающей наибольшие затруднения в ряду дифференциальной диагностики ЭоЭ.

Следует подчеркнуть, что «эозинофильный эзофагит» является клинико-морфологическим диагнозом, для верификации которого необходима совместная работа гастроэнтеролога, эндоскописта и патоморфолога. Основной клинический признак ЭоЭ – дисфагия. При эндоскопическом исследовании выявляются признаки EREFS (Endoscopic Reference Score): белесоватые очаги экссудативного налета, множественные концентрические сужения пищевода, отек, продольные борозды в слизистой оболочке пищевода и наличие стриктур. Важнейшим патоморфологическим критерием служит выявление в многослойном плоском эпителии пищевода более 15 эозинофилов в поле зрения

при  $\times 400$  [1–6]. Однако интраэпителиальная инфильтрация эозинофилами слизистой оболочки пищевода также не является специфичной и может наблюдаться при ГЭРБ, целиакии, воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) и т.д. [14, 15]. В то же время недавние исследования демонстрируют, что эозинофилия пищевода не связана патогенетически с некоторыми из этих заболеваний. Данный обзор показывает современное состояние проблемы дифференциальной диагностики ЭоЭ.

## *Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь*

Представления о взаимосвязи ЭоЭ и ГЭРБ менялись на протяжении всего периода изучения ЭоЭ. Интраэпителиальная инфильтрация эозинофилами при ГЭРБ описана впервые в педиатрической практике в 1982 году [16], то есть еще до выделения ЭоЭ как самостоятельной единицы, которое началось в 1993 году с работы S.E. Attwood et al. [17]. Для исключения ГЭРБ в первом консенсусе Американской ассоциации гастроэнтерологов (American Gastroenterological Association, AGA) по ЭоЭ предлагался следующий критерий: отсутствие изменений при рН-метрии и отсутствие ответа на терапию ингибиторами протонной помпы (ИПП) [18]. В последующем была выделена подгруппа пациентов с эозинофилией слизистой оболочки пищевода, у которых улучшаются клинические симптомы при терапии ИПП, получившей историческое название «эозинофилия пищевода, отвечающая на терапию ИПП» [7, 19]. Показано, что от 30 до 75% пациентов с ЭоЭ отвечают на терапию ИПП, что делает выделение данной промежуточной группы нецелесообразным.

В то же время дифференциальная диагностика ГЭРБ и ЭоЭ исключительно важна как ввиду высокой распространенности ГЭРБ, так и вследствие большого сходства клинических проявлений. Наиболее значимыми в дифференциальной диагностике клиническими признаками ГЭРБ являются преобладание изжоги и редкая манифестация дисфагии [20]. При гистологическом исследовании у пациентов с ГЭРБ выявляются относительно низкое число интраэпителиальных эозинофилов, отсутствие дегрануляции эозинофилов и эозинофильных абсцессов.

Все больше данных указывает на то, что ГЭРБ и ЭоЭ не всегда обнаруживаются изолированно, а в ряде случаев могут сочетаться друг с другом [2, 21]. Так, нарушение эпителиального барьера при ГЭРБ вызывает Т2-иммунный ответ, который может сопровождаться привлечением эозинофилов, что объясняет наличие низкого числа эозинофилов в слизистой оболочке пищевода у пациентов с ГЭРБ. В свою очередь, эозинофильное воспаление при ЭоЭ приводит к высвобождению вазоактивного интестинального пептида и тромбоцитаактивирующего фактора, которые влияют на тонус гладкомышечных клеток нижнего пищеводного сфинктера, приводя к их расслаблению, что облегчает развитие гастроэзофагеального рефлюкса. Такие комплексные взаимодействия объясняют эффективность ИПП при ЭоЭ.

Основные клинические и патоморфологические признаки, позволяющие отличить ЭоЭ и ГЭРБ, приведены в таблице 1.

**Целиакия**

Целиакия представляет собой аутоиммунную энтеропатию, в основе которой лежит непереносимость глютена у генетически предрасположенных лиц – носителей *HLA-DQ2*, *HLA-DQ8* и реже *HLA-DQ7* [22]. Заболевание чаще встречается у женщин [23]. Основными симптомами являются диарея и мальабсорбция. У пациентов в сыворотке крови выявляются антитела к тканевой трансглутаминазе (anti-tTG) и антиэндомизимальные антитела (EmA). Основными участниками иммунного ответа при глютенной энтеропатии являются специфические CD4+ Т-лимфоциты. Накопление интраэпителиальных лимфоцитов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки при отсутствии или наличии атрофии крипт – патогномичный признак данного заболевания [24].

Целиакия может сочетаться с разными другими аутоиммунными заболеваниями [24]. Кроме того, про-

слеживается связь целиакии с атопическими состояниями и особенно атопическим дерматитом [25, 26]. Именно это обстоятельство дает биологическое основание для поиска общности между целиакией и ЭоЭ.

У пациентов с целиакией эозинофилия слизистой оболочки пищевода была описана первоначально в маленьких сериях наблюдений [27–29], что привело к предположению об их взаимосвязи. Однако в более крупных исследованиях и по данным метаанализа связь между этими заболеваниями не выявлена [30–32]. В метаанализе [30] показано, что эозинофилия слизистой оболочки пищевода обнаружена у 0–10,7% пациентов с целиакией, тем не менее большая гетерогенность не позволяет аппроксимировать эти данные на общую популяцию. Вероятно, в небольшом числе случаев ЭоЭ может сочетаться с целиакией, но не является ее проявлением [33]. Кроме того, диета с ограничением глютена оказывается малоэффективной для купирования ЭоЭ у пациентов с целиакией [30]. Отличительные особенности целиакии и ЭоЭ приведены в таблице 2.

**Воспалительные заболевания кишечника**

При болезни Крона и неспецифическом язвенном колите пищевод поражается редко, при этом могут наблюдаться изменения также в желудке и/или двенадцатиперстной кишке, преобладает лимфоцитарная инфильтрация (лимфоцитарный эзофагит) [14, 34, 35], поэтому морфологическая картина ЭоЭ с выраженным доминированием интраэпителиальных эозинофилов позволяет уверенно дифференцировать данные нозологические формы (табл. 3). При этом в ряде случаев ЭоЭ может сочетаться с ВЗК, но не является их проявлением. В некоторых работах показано, что ЭоЭ выявляется у пациентов с ВЗК в 2–5 раз чаще, чем в общей популяции [36, 37]. Напротив, в крупном популяционном исследовании была выявлена обратная связь между ВЗК и ЭоЭ [38].

Таблица 1 | Table 1

**Основные различия между ГЭРБ и ЭоЭ | Main differences between GERD and EoE**

Признак   Feature	ГЭРБ   GERD	ЭоЭ   EoE
Возраст, лет   Age, years	>50   >50	<50   <50
Пол (мужчин : женщин)   Sex (male-to-female ratio)	1:1	3:1
Связь с атопией   Atopy association	Нет   No	Есть   Yes
Основные симптомы   Major symptoms	Изжога   Heartburn Регургитация   Regurgitation	Дисфагия   Dysphagia Болюсная обструкция   Bolus obstruction
Эозинофилия слизистой пищевода   Eosinophilia of the esophageal mucosa	Нехарактерна   Not typical	Основной признак   Dominant feature
Число интраэпителиальных эозинофилов   Intraepithelial eosinophil count	<7 в поле зрения при ×400   <7 at high-power view field (×400)	≥15 в поле зрения при ×400   ≥15 at high power view field (×400)
Преобладающие иммунные клетки в инфильтрате   Predominant immune cells in the infiltrate	Т-лимфоциты   T-lymphocytes	Эозинофилы   Eosinophils

Таблица 2 | Table 2

**Сравнительная характеристика ЭоЭ и целиакии | Comparative analysis of EoE and celiac disease**

Признак   Feature	ЭоЭ   EoE	Целиакия   Celiac disease
Возраст   Age	Дети и молодые взрослые   Children and young adults	Дети и молодые взрослые   Children and young adults
Пол (мужчин : женщин)   Sex (male-to-female ratio)	3:1	1:2–2,5
Связь с атопией   Atopy association	+++	+/-
Аллергены   Allergens	Любые, включая пищевые и воздушные аллергены   Any, including food and air allergens	Глютен   Gluten
Диета с ограничением глютена   Gluten-restricted diet	Неэффективна   Ineffective	Эффективна   Effective
Поражаемый орган   Organ involved	Пищевод   Esophagus	Первично – тонкая кишка   Primarily small intestine
Преобладающие иммунные клетки в инфильтрате   Predominant immune cells in the infiltrate	Эозинофилы   Eosinophils	CD4+ Т-лимфоциты   CD4+ T-lymphocytes

Таблица 3 | Table 3

**Дифференциальная диагностика ВЗК и ЭоЭ | Differential diagnosis between EoE and IBDs**

Признак   Feature	ЭоЭ   EoE	ВЗК   IBD
Возраст   Age	Дети и молодые взрослые   Children and young adults	Дети и молодые взрослые   Children and young adults
Пол (мужчин : женщин)   Sex (male-to-female ratio)	3:1	≈1:1
Связь с атопией   Atopy association	+	–
Поражение пищевода   Esophageal involvement	Обязательно   Mandatory	Возможно у части пациентов с поражением других отделов желудочно-кишечного тракта. Чаще у детей   Possible in patients with the involvement of other GI tract organs. More often in children
Преобладающие иммунные клетки в инфильтрате   Predominant immune cells in the infiltrate	Эозинофилы   Eosinophils	Лимфоциты   Lymphocytes
Наличие интраэпителиальных эозинофилов   Presence of intraepithelial eosinophils	+++	-/+

*Лимфоцитарный эзофагит*

Клиническими проявлениями лимфоцитарного эзофагита являются дисфагия, боль в животе, изжога и диарея. У пациентов также может возникать острое вклинение пищи в пищевод [39] – состояние, которое наиболее часто выявляется при ЭоЭ. Не только клиническая картина, но и эндоскопические признаки лимфоцитарного эзофагита во многом сходны с таковыми при ЭоЭ [39–42]. В то же время пациенты с ЭоЭ обычно моложе, и при лимфоцитарном эзофагите отмечается

преобладание женщин [43]. Основные признаки лимфоцитарного эзофагита приведены в таблице 4.

При гистологическом исследовании лимфоцитарный эзофагит характеризуется обилием перипапиллярных интраэпителиальных лимфоцитов в сочетании с выраженным межклеточным отеком (спонгиоз) многослойного плоского эпителия и отсутствием или наличием лишь единичных интраэпителиальных гранулоцитов в слизистой оболочке пищевода [42]. При этом пороговое значение для количества интраэпителиальных



Таблица 4 | Table 4

## Отличительные признаки лимфоцитарного эзофагита и ЭоЭ | Differential features of lymphocytic esophagitis and EoE

Признак   Feature	Лимфоцитарный эзофагит   Lymphocytic esophagitis	ЭоЭ   EoE
Возраст   Age	Медиана 50–60 лет   Median 50–60 years	Дети и молодые взрослые   Children and young adults
Пол (мужчин : женщин)   Sex (male-to-female ratio)	Женщин > мужчин   Female > male	3:1
Связь с атопией   Association with atopy	+/-	+++
Преобладающие клетки в инфильтрате   Predominant cells in the infiltrate	CD3+ Т-лимфоциты   CD3+ T-lymphocytes	Эозинофилы   Eosinophils
Наличие интраэпителиальных эозинофилов   Presence of intraepithelial eosinophils	Могут быть лишь единичные   Individual cells may be found	Преобладают   Predominant cells
Локализация воспалительного инфильтрата   Location of the infiltrate	Перипапиллярно   Peripapillary	По всей толще эпителиального пласта, включая поверхностные отделы   Whole epithelial thickness, including surface layers

лимфоцитов, необходимых для диагностики лимфоцитарного эзофагита, в настоящее время не определено и в разных исследованиях колеблется от  $\geq 10$  до  $\geq 50$  лимфоцитов в поле зрения при  $\times 400$  [44]. Гистологическая картина изменений слизистой оболочки пищевода при лимфоцитарном эзофагите напоминает картину аллергического контактного дерматита [45], что косвенно свидетельствует о роли аллергического компонента в патогенезе лимфоцитарного эзофагита, хотя этиология этого заболевания на данный момент остается неизвестной. В то же время связь с аллергическими состояниями выявляется лишь у небольшого числа пациентов с лимфоцитарным эзофагитом (сезонная пищевая аллергия у 13,6% пациентов, бронхиальная астма у 14,8%) [43]. Описана также сочетанная морфологическая картина лимфоцитарного эзофагита и ЭоЭ [39, 41].

*Герпесвирусный эзофагит*

Герпесвирусный эзофагит имеет характерные морфологические признаки – наличие базофильных ядерных вирусных включений в виде матового стекла, а также многоядерных клеток внутри эпителиального пласта слизистой оболочки пищевода. Герпесвирусный эзофагит подтверждается при позитивном иммуногистохимическом окрашивании с HSV I+II, положительной ПЦР на HSV и положительных серологических тестах с определением IgG и IgM к HSV. В наблюдениях на небольших группах пациентов описана связь герпесвирусного эзофагита с эозинофилией слизистой оболочки пищевода и ЭоЭ как у иммунокомпетентных детей, так и у иммунокомпрометированных взрослых [46–49]. Так, К.А. Squires et al. [46] впервые опубликовали три наблюдения острого герпесвирусного эзофагита у подростков с атопией, спустя 1–2 месяца после которого был выявлен ЭоЭ. В серии наблюде-

ний у детей и подростков J. Fritz et al. [47] выявили эозинофилию слизистой оболочки пищевода у пяти из 11 иммунокомпетентных пациентов, перенесших герпесвирусный эзофагит, при этом у одного из пяти пациентов ЭоЭ был диагностирован ранее. На основании имеющихся данных высказано предположение о возможной каузальной роли вируса простого герпеса 1-го типа в развитии ЭоЭ. В то же время в части наблюдений ЭоЭ при наличии атопии является фоном для развития герпесвирусного эзофагита вследствие нарушения целостности слизистой оболочки пищевода [48]. Таким образом, вопрос, что возникает раньше – герпесвирусный эзофагит или ЭоЭ – остается открытым.

*Ахалазия пищевода*

Ахалазия является редким заболеванием, в основе которого лежит нарушение перистальтики пищевода с вовлечением нижнего пищеводного сфинктера, что проявляется развитием дисфагии. К другим симптомам относятся регургитация переваренной пищи, ночной кашель, аспирационные пневмонии, потеря веса.

При ахалазии пищевода происходит снижение числа нервных ганглиев в его межмышечных сплетениях, сопровождающееся инфильтрацией цитотоксическими лимфоцитами (хронический ганглионит). В сыворотке крови пациентов могут обнаруживаться миентериальные антитела. В патогенезе ахалазии так же, как при ЭоЭ, рассматривают связь с герпесвирусной инфекцией (HSV-1). Основные патогистологические изменения при ахалазии определяются в мышечной оболочке пищевода. Тем не менее может наблюдаться также повышенное число интраэпителиальных эозинофилов ( $>15$  в поле зрения при  $\times 400$ ), при этом эозинофильная инфильтрация более выражена в подслизистой основе [14, 50].

В то же время ЭоЭ путем гуморальной регуляции приводит к изменениям перистальтики пищевода [51, 52], также вызывая дисфагию. Частота ахалазии у пациентов с ЭоЭ достигает 7,3% [53]. Остаются открытыми вопросы, может ли эозинофилия слизистой оболочки пищевода быть следствием ахалазии, а также возможно ли развитие ахалазии в результате эозинофильного воспаления.

Сравнительная характеристика ахалазии и ЭоЭ приведена в таблице 5.

*Интрамуральный псевдодивертикулез пищевода*

Интрамуральный псевдодивертикулез пищевода – редкое идиопатическое состояние, характеризующееся мелкими протрузиями в его стенке, которые при гистологическом исследовании представлены дилатированными выводными протоками эзофагеальных желез с признаками хронического воспаления [15]. Как и ЭоЭ, клинически это заболевание проявляется дисфагией и эпизодами болюсной обструкции (вклинения пищи в пищевод). Преобладают мужчины (78%) [54], зачастую с анамнезом пагубного употребления алкоголя (76%) и курения (57%) [55]. Кроме того, эндоскопическая картина у 76% пациентов напоминает трахеевидный пищевод, характерный для ЭоЭ [55]. В единичных наблюдениях интрамуральный псевдодивертикулез пищевода сопровождается выраженной интраэпителиальной инфильтрацией эозинофилами и ЭоЭ [56, 57]. Интересно, что у пациентов с сочетанием этих нозологий псевдодивертикулы обнаруживаются в средней трети пищевода, а при изолированном псевдодивертикулезе в проксимальной трети [56].

*Системные заболевания соединительной ткани и аутоиммунные заболевания*

Выявление ЭоЭ при системных заболеваниях, скорее, казуистика. Эозинофильный гастрит, гастроэнте-

рит или колит при системных заболеваниях выявляются несколько чаще. Они описаны при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, дерматомиозите и полимиозите, первичном синдроме Шегрена и смешанном заболевании соединительной ткани (синдром перекреста) [58]. Эозинофильная инфильтрация слизистой оболочки пищевода наблюдается при ревматоидном артрите [59], псориазе, аутоиммунном тиреоидите [60]. Выявлено также сочетание ЭоЭ с синдромом Марфана, Элерса–Данлоса и синдромом гипермобильности суставов [61].

*Эозинофилия пищевода после радиочастотной абляции пищевода Барретта*

Пищевод Барретта (ПБ) – это позднее осложнение ГЭРБ, морфологическим субстратом которого является развитие кишечной метаплазии в дистальном отделе пищевода [62], наиболее подверженном действию рефлюктата. ПБ – пренеопластическое состояние пищевода, при котором риск развития аденокарциномы повышен в 30–40 раз [63]. На морфологическом уровне цепочка канцерогенеза выглядит следующим образом: ПБ без дисплазии – ПБ с дисплазией низкой степени – ПБ с дисплазией высокой степени – аденокарцинома пищевода. Неуклонный рост показателей заболеваемости раком пищевода за счет увеличения числа случаев впервые диагностированной аденокарциномы пищевода делает диагностику ПБ чрезвычайно важной задачей для канцеропревенции [64].

Радиочастотная абляция (РЧА) показала свою высокую эффективность в предотвращении развития тяжелой дисплазии и аденокарциномы пищевода у пациентов с низкой дисплазией в пределах сегмента ПБ [65, 66]. РЧА считается достаточно безопасной процедурой, наиболее частым ее осложнением являются стриктуры пищевода, которые возникают

Таблица 5 | Table 5

Сравнительные особенности ахалазии и ЭоЭ | Features of achalasia and EoE

Признак   Feature	Ахалазия   Achalasia	ЭоЭ   EoE
Возраст   Age	>50 лет   >50 years	Дети и молодые взрослые   Children and young adults
Пол (мужчин : женщин)   Age (male-to-female ratio)	1:1	3:1
Связь с атопией   Atopy association	–	+
Локализация основных патоморфологических изменений   Location of pathomorphological changes	Межмышечные сплетения   Myenteric plexus	Слизистая оболочка пищевода   Esophageal mucosa
Нарушения моторики пищевода   Dysmotility	+++	+/-
Наличие эозинофилов   Presence of eosinophils	Необязательно. Чаще в подслизистой основе   Not necessary. More common in the submucosa	Интраэпителиально   Intraepithelial

в 5,6–12% наблюдений [65, 67], частота развития кровотечений составляет около 1%, перфорации – 0,6% [67]. После РЧА происходит эпителизация слизистой оболочки пищевода многослойным плоским эпителием. Помимо РЧА методами абляционной терапии являются фотодинамическая и криотерапия. После абляционной терапии в различных модальностях в 2,7–9% наблюдений описано возникновение интраэпителиальной эозинофильной инфильтрации [68–70]. В исследовании N. Villa et al. [68] эозинофилия слизистой оболочки пищевода обнаружена у четырех из 148 пациентов (2,7%) спустя 1–3 месяца после РЧА у тех, кому выполняли процедуру абляции 2 раза или более. При этом эозинофилия слизистой оболочки пищевода сохранялась в течение года и дольше. Несмотря на увеличение числа интраэпителиальных эозинофилов, у пациентов после РЧА не выявлены эозинофильные абсцессы и межклеточный отек, а базальноклеточная гиперплазия были слабее, чем при ЭоЭ. Ни у одного из пациентов не было симптомов дисфагии. При эндоскопическом исследовании не отмечено никаких признаков ЭоЭ. Однако у трех из четырех пациентов были аллергические заболевания. В исследовании K.D. Halsey et al. [69] эозинофилия слизистой оболочки пищевода выявлена у 20 из 122 пациентов (9%) после абляционной терапии, чаще после криотерапии, чем после РЧА. Наличие повышенного числа интраэпителиальных эозинофилов было также связано с большей длиной сегмента ПБ. Медиана времени развития эозинофилии после абляционной терапии составила 12,9 месяца. У 70% пациентов эозинофилия слизистой оболочки спонтанно разрешилась, у шести пациентов персистировала на протяжении всего периода динамического наблюдения с медианой 20,2 месяца. Ни у одного из пациентов не была выявлена атопия.

В исследовании V.L. Owens et al. [70] эозинофилия слизистой оболочки пищевода  $\geq 15$  эозинофилов в поле зрения при  $\times 400$  наблюдалась у 13 из 385 пациентов (3,4%) после фотодинамической терапии – технологии абляции, которая использовалась до разработки и внедрения РЧА. В этом исследовании у всех пациентов диагностирован длинный сегмент ПБ, у 38,4% пациентов процедура фотодинамической терапии была выполнена более одного раза. Эозинофилия слизистой оболочки пищевода выявлена через 83–692 дня после абляции. У 38,5% пациентов самое высокое число интраэпителиальных эозинофилов отмечалось спустя 3 месяца после абляции. Повышенное число эозинофилов в слизистой оболочке пищевода персистировало в течение 4–69 месяцев и у 53,85% пациентов сохранялось на протяжении всего времени наблюдения. Только у одного пациента выявлены признаки атопии. У девяти пациентов (69,23%) симптомы дисфагии не обнаружены. У двух пациентов с частыми симптомами дисфагии диагностирована стриктура пищевода после абляции. Ни у одного из пациентов не выявлена эндоскопическая картина ЭоЭ. Эозинофилы локализовались в нижних 2/3 эпителиального пласта, в то время как при ЭоЭ они располагаются более поверхностно; эозинофильные абсцессы также не обнаружены.

Таким образом, эозинофилия после абляционной терапии при ПБ имеет свои особенности, обобщенные в таблице 6.

#### *Патоморфологические критерии эозинофильного эзофагита*

Эозинофилия слизистой оболочки пищевода является неспецифическим признаком, который требует дифференциальной диагностики целого ряда

Таблица 6 | Table 6

**Отличительные особенности эозинофилии слизистой оболочки пищевода после абляционной терапии ПБ | Features of eosinophilia of the esophageal mucosa after ablation for Barrett's esophagus (BE)**

Признак   Feature	ЭоЭ   EoE	ПБ после абляционной терапии   BE after ablation
Возраст   Age	Дети и молодые взрослые   Children and young adults	Более старшая возрастная группа (40+)   Older age (40+)
Пол (мужчин : женщин)   Sex (male-to-female ratio)	3:1	3:1
Связь с атопией   Atopy association	+++	–
Дисфагия   Dysphagia	Часто   Common	Редко   Rare
Эндоскопическая картина   Endoscopic features	Соответствует шкале EREFS   Consistent with EREFS score	Постабляционные изменения   Post-ablation changes
Повышенное число эозинофилов   Elevated count of eosinophils	В верхних слоях эпителиального пласта   At surface epithelial compartment	В нижних 2/3 эпителиального пласта   Lower 2/3 epithelium
Эозинофильные абсцессы   Eosinophilic abscesses	+++	–

заболеваний желудочно-кишечного тракта. В то же время морфологическая диагностика остается золотым стандартом верификации диагноза. При этом для диагностики ЭоЭ требуется соблюдать технику правильного взятия материала – не менее шести биоптатов из разных отделов пищевода [1, 4, 71, 72]. Это необходимо, потому что гистологическая картина при ЭоЭ может быть вариабельной и мозаичной, оценка не менее шести биоптатов позволяет достичь диагностической точности до 100%. Взятие биоптатов из дистального и проксимального или среднего отделов пищевода помогает также оценить градиент эозинофильной инфильтрации. При ЭоЭ эозинофильная инфильтрация слизистой оболочки, как правило, наблюдается в нескольких отделах пищевода. При ГЭРБ также возможно поражение нескольких отделов, однако эозинофилия выражена более слабо.

Степень выраженности эозинофилии слизистой оболочки пищевода при ЭоЭ может варьировать в широких пределах, вплоть до формирования микроабсцессов, то есть отграниченных скоплений эозинофилов внутри эпителиального пласта (рис. 1). Для разграничения ГЭРБ и ЭоЭ было принято пороговое значение >15 эозинофилов в поле зрения при ×400. В связи с цифровизацией лабораторий в настоящее время рассчитывают количество эозинофилов >15 на площади 0,3 мм<sup>2</sup>. Наряду с этим существуют другие характерные патогистологические признаки ЭоЭ.

Привлечение эозинофилов в слизистую оболочку пищевода при ЭоЭ с их последующей дегрануляцией происходит вследствие стимуляции антигенпре-

зентирующих клеток под воздействием различных аллергенов с активацией Th2-иммунного ответа, повышением уровня цитокинов IL-13, IL-5 и IL-4 и высвобождением эотоксина-3 [73–75], кодирующегося геном *CCL26* и связывающегося с рецептором CCR3. В эпителиальных клетках слизистой оболочки пищевода под воздействием эотоксина-3 происходит нарушение белков межклеточных контактов клаудина 1 и 4, E-кадгерина [76]. IL-13 вызывает также снижение уровня белка десмосом десмоглеина 1 (DSG-1) путем активации кальпонины CAPN14 [77], что нарушает целостность эпителиального барьера с нарастанием внутриэпителиального отека вплоть до спонгиоза, с реактивной базальноклеточной гиперплазией и нарушением дифференцировки эпителиоцитов с формированием дискератоза. В свою очередь, повышение уровня TGF-β [78], экспрессирующегося Т-лимфоцитами и тучными клетками, ответственно за ремоделирование подслизистой основы пищевода путем активации миофибробластов с отложением коллагена в подслизистой основе и развитием фиброза (рис. 2).

С целью повышения точности диагностики ЭоЭ и исключения других заболеваний пищевода, прежде всего ГЭРБ, была разработана балльная шкала активности ЭоЭ, которая помимо определения выраженности интраэпителиальной эозинофилии включает в себя следующие параметры: толщина базального слоя многослойного плоского эпителия пищевода, наличие эозинофильных абсцессов, наличие эозинофилов на поверхности эпителиального пласта, выраженность интраэпителиального отека,

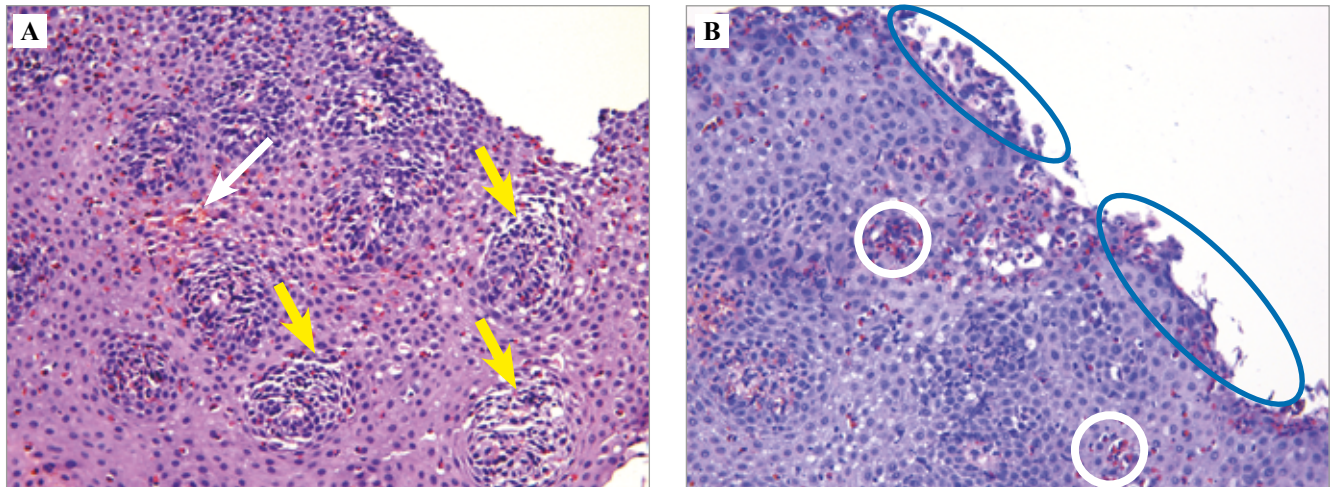


Рис. 1. Патоморфологическая картина ЭоЭ.

А – массивная интраэпителиальная инфильтрация эозинофилами с их дегрануляцией (белая стрелка) и выраженным интраэпителиальным отеком вплоть до спонгиоза (желтые стрелки), В – интраэпителиальная инфильтрация эозинофилами с наличием эозинофильных абсцессов (белые круги), поверхностного напластования эозинофилов и выраженного поверхностного повреждения эпителия (синие овалы). Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 1. EoE histological features.

A – massive intraepithelial infiltration with eosinophils, accompanied by degranulation of eosinophils (white arrow) and prominent dilated intercellular spaces forming spongiosis (yellow arrows), B – intraepithelial infiltration with eosinophils, accompanied by eosinophilic abscesses (white circles), eosinophils surface layering and prominent surface epithelial alteration (blue ellipses). H&E stain, ×200

наличие повреждения поверхностного эпителия, дискератоз и степень выраженности подэпителиального фиброза. [6, 12, 79] (табл. 7).

Кроме того, при ЭоЭ рекомендуется брать биоптаты также из желудка и двенадцатиперстной кишки для исключения их эозинофильного поражения.

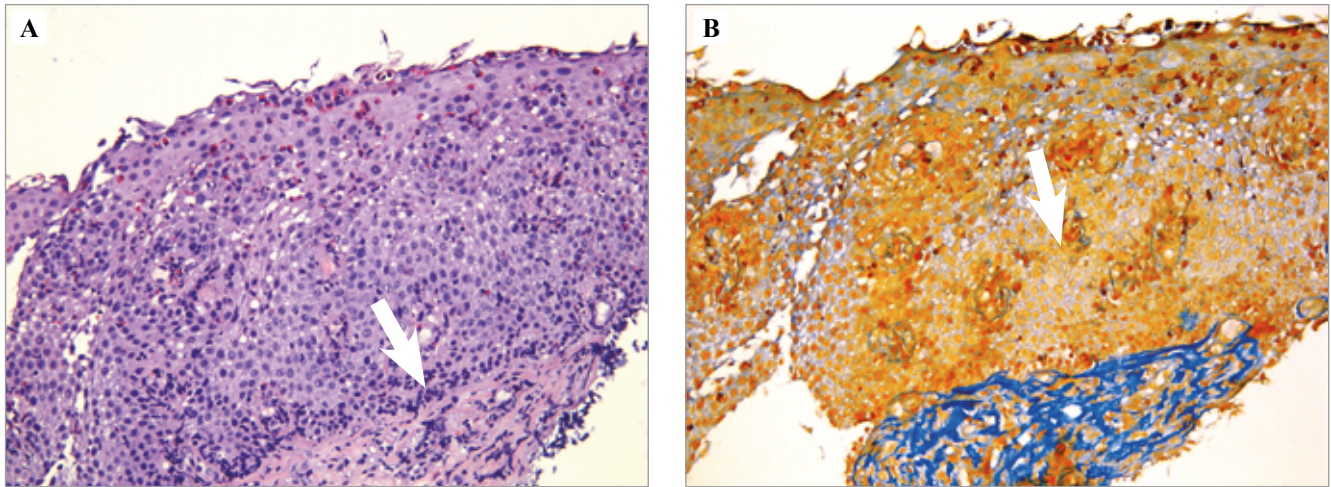


Рис. 2. Фиброз собственной пластинки слизистой оболочки при ЭоЭ (белые стрелки). А – окраска гематоксилином и эозином, ×200, В – окраска по Маллори, ×200

Fig. 2. Lamina propria fibrosis in EoE (white arrows). А – H&E stain, ×200, В – Mallory stain, ×200

Таблица 7 | Table 7

**Морфологическая шкала оценки эозинофильного эзофагита в баллах (ЕоEHSS) | Eosinophilic esophagitis histological scoring system (EoEHSS)**

Гистологические критерии   Histological criteria	Степень поражения   Grade score	Распространенность (стадия)   Stage score
Эозинофильная инфильтрация   Eosinophilic inflammation	0 – интраэпителиальные эозинофилы отсутствуют   0 – intraepithelial eosinophils not present 1 – ПЭЧ <15/ПЗР <sup>2</sup> , ×400   1 – PEC <15/HPF 2 – ПЭЧ 15–59/ПЗР, ×400   2 – PEC 15–59/HPF 3 – ПЭЧ >60/ПЗР, ×400   3 – PEC >60/HPF	0 – интраэпителиальные эозинофилы 0–14/ПЗР, ×400   0 – intraepithelial eosinophils 0–14/HPF, ×400 1 – ПЭЧ ≥15/ПЗР, ×400 в <33% ПЗР, ×400   1 – PEC ≥15/HPF in <33% of HPFs 2 – ПЭЧ ≥15/ПЗР, ×400 в 33–66% ПЗР, ×400   2 – PEC ≥15/HPF in 33–66% of HPFs 3 – ПЭЧ ≥15/ПЗР, ×400 в >66% ПЗР, ×400   3 – PEC ≥15/HPF in >66% of HPFs
Базальный слой плоского эпителия пищевода   Epithelial basal zone	0 – ГБС <sup>3</sup> отсутствуют   0 – BZH not present 1 – базальная зона занимает >15%, но <30% общей толщины эпителия   1 – basal zone occupies >15% but <33% of total epithelial thickness 2 – базальная зона занимает 33–66% общей толщины эпителия   2 – basal zone occupies 33–66% of total epithelial thickness 3 – базальная зона занимает >66% общей толщины эпителия   3 – basal zone occupies >66% of total epithelial thickness	0 – ГБС отсутствуют   0 – BZH not present 1 – ГБС (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – BZH (any grade >0) in <33% of epithelium 2 – ГБС (любой степени >0) в 33–66% эпителия   2 – BZH (any grade >0) in 33–66% of epithelium 3 – ГБС (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – BZH (any grade >0) in >66% of epithelium
Эозинофильные абсцессы (ЭА <sup>4</sup> )   Eosinophil abscess (EA)	0 – скопление эозинофилов не определяется   0 – groups or aggregates of eosinophils not present 1 – скопление 4–9 эозинофилов   1 – group of 4–9 eosinophils 2 – скопление 10–20 эозинофилов   2 – group of 10–20 eosinophils 3 – скопление >20 эозинофилов   3 – group of >20 eosinophils	0 – скопление эозинофилов не определяется   0 – groups or aggregates of eosinophils not present 1 – ЭА (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – EA (any grade >0) in <33% of the epithelium 2 – ЭА (любой степени >0) в 33–66% эпителия   2 – EA (any grade >0) in 33–66% of the epithelium 3 – ЭА (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – EA (any grade >0) in >66% of the epithelium

Гистологические критерии   Histological criteria	Степень поражения   Grade score	Распространенность (стадия)   Stage score
Эозинофильное поверхностное наложение (ПН <sup>5</sup> ) (пластообразование)   Eosinophil surface layering (SL)	0 – ПН отсутствует (<3 линейно расположенных эозинофилов)   0 – absent SL (fewer than 3 aligned eosinophils) 1 – ПН 3–4 эозинофила   1 – SL of 3–4 eosinophils 2 – ПН 5–10 эозинофилов   2 – SL of 5–10 eosinophils 3 – ПН >10 эозинофилов   3 – SL of >10 eosinophils	0 – ПН отсутствует   0 – absent SL 1 – ПН (любая степень >0) в <33% эпителия   1 – SL (any grade >0) in <33% of the epithelium 2 – ПН (любая степень >0) в <33–66% эпителия   2 – SL (any grade >0) in 33–66% of the epithelium 3 – ПН (любая степень >0) в >66% эпителия   3 – SL (any grade >0) in >66% of the epithelium
Расширенные межклеточные пространства (РМП <sup>6</sup> )   Dilated intercellular spaces (DIS)	0 – РМП не определяется при любом увеличении   0 – DIS not seen at any magnification 1 – межклеточные мостики в РМП различимы только при ×400   1 – intercellular bridges in DIS visible at ×400 only 2 – межклеточные мостики в РМП различимы при ×200   2 – intercellular bridges in DIS visible at ×200 3 – межклеточные мостики в РМП различимы при ×100 и больше   3 – intercellular bridges in DIS visible at ×100 or lower	0 – РМП не определяется при любом увеличении   0 – DIS not seen at any magnification 1 – РМП (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – DIS (any grade >0) in <33% of the epithelium 2 – РМП (любой степени >0) в <33–66% эпителия   2 – DIS (any grade >0) in 33–66% of the epithelium 3 – РМП (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – DIS (any grade >0) in >66% of the epithelium
Повреждение поверхностного эпителия (ППЭ <sup>7</sup> )   Surface epithelial alteration (SEA)	0 – ППЭ не определяется   0 – SEA not present 1 – ППЭ без эозинофилов   1 – SEA without eosinophils 2 – ППЭ с любым количеством эозинофилов   2 – SEA with any eosinophils 3 – слущивание ППЭ в сочетании с большим количеством эозинофилов   3 – shed-altered surface epithelium admixed with numerous eosinophils	0 – ППЭ не определяется   0 – SEA not present 1 – ППЭ (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – SEA (any grade >0) in <33% of the epithelium 2 – ППЭ (любой степени >0) в <33–66% эпителия   2 – SEA (any grade >0) in 33–66% of the epithelium 3 – ППЭ (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – SEA (any grade >0) in >66% of the epithelium
Дискератоз (эпителиальные клетки с дискератозом, ДЭК <sup>8</sup> )   Dyskeratotic epithelial cells (DEC)	0 – ДЭК не определяется   0 – DEC not present 1 – 1 ДЭК/ПЗР, ×400   1 – 1 DEC/HPF, ×400 2 – 2–5 ДЭК/ПЗР, ×400   2 – 2–5 DEC/HPF, ×400 3 – >5 ДЭК/ПЗР, ×400   3 – >5 DEC/HPF, ×400	0 – дискератоз не определяется   0 – DEC not present 1 – дискератоз (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – DEC (any grade >0) in <33% of the epithelium 2 – дискератоз (любой степени >0) в <33–66% эпителия   2 – DEC (any grade >0) in 33–66% of the epithelium 3 – дискератоз (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – DEC (any grade >0) in >66% of the epithelium
Фиброз собственной пластинки (ФСП <sup>9</sup> ) слизистой оболочки   Lamina propria fibrosis (LPF)	0 – ФСП не определяется   0 – LPF not present 1 – волокна сцеплены друг с другом, пространство между ними не определяется   1 – fibers are cohesive and interfiber spaces cannot be demarcated 2 – диаметр волокон равен диаметру ядер клеток базального слоя   2 – fiber diameter equals the diameter of the basal cell nucleus 3 – диаметр волокон превышает диаметр ядер клеток базального слоя   3 – fiber diameter exceeds the diameter of the basal cell nucleus	0 – ФСП не определяется   0 – LPF not present 1 – ФСП (любой степени >0) в <33% эпителия   1 – LPF (any grade >0) in <33% of the lamina propria 2 – ФСП (любой степени >0) в <33–66% эпителия   2 – LPF (any grade >0) in 33–66% of the lamina propria 3 – ФСП (любой степени >0) в >66% эпителия   3 – LPF (any grade >0) in >66% of the lamina propria

<sup>1</sup> ПЭЧ – пиковое эозинофильное число при оценке участка с наиболее выраженными воспалительными изменениями |

PEC – peak eosinophil count

<sup>2</sup> ПЗР – поле зрения при ×400 | HPF – high-power field (×400)

<sup>3</sup> ГБС – гиперплазия базального слоя | BZH – basal zone hyperplasia

<sup>4</sup> ЭА – эозинофильные абсцессы | EA – eosinophil abscess

<sup>5</sup> ПН – поверхностное наложение | SL – eosinophil surface layering

<sup>6</sup> РМП – расширенные межклеточные пространства | DIS – dilated intercellular spaces

<sup>7</sup> ППЭ – повреждение поверхностного эпителия | SEA – surface epithelial alteration

<sup>8</sup> ДЭК – эпителиальные клетки с дискератозом | DEC – dyskeratotic epithelial cells

<sup>9</sup> ФСП – фиброз собственной пластинки слизистой оболочки | LPF – lamina propria fibrosis

## Заключение

Спектр дифференциальной диагностики эозинофильного эзофагита многообразен и требует мультидисциплинарного подхода к пациентам. В этом ряду как часто встречающаяся патология пищевода, к которой относится гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, так и большое число редких заболеваний, казуистическое сочетание которых с эозинофильным эзофагитом больше запутывает, чем проливает свет на истинный облик последнего. Так, потребовалось немало исследований, чтобы опровергнуть связь эозинофильного эзофагита с целиакией, болезнью Крона и неспецифическим язвенным колитом.

Впрочем, патогенез эозинофильного эзофагита все еще недостаточно изучен, и особый интерес представляют случаи с перекрестом клинических и патоморфологических признаков эозинофильного эзофагита и других заболеваний пищевода, в том числе смешанный фенотип гастроэзофагеальной рефлюксной болезни/эозинофильного эзофагита и лимфоцитарного эзофагита/эозинофильного эзофагита, которые требуют дальнейшего исследования.

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

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

## Литература/References

1. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias A, von Arnim U, Brede-noord AJ, Bussmann C, Amil Dias J et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: Evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterol J.* 2017;5(3):335–58. DOI: 10.1177/2050640616689525.
2. Dellon ES, Liacouras CA, Molina-Infante J, Furuta GT, Spergel JM, Zevit N et al. Updated international consensus diagnostic criteria for eosinophilic esophagitis: Proceedings of the AGREE Conference. *Gastroenterology.* 2018;155(4):1022–33. e10. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.07.009.
3. Ferreira CT, Vieira MC, Furuta GT, Barros FCLF, Chegade M. Eosinophilic esophagitis – Where are we today? *J Pediatr (Rio J).* 2019;95(3):275–81. DOI: 10.1016/j.jpmed.2018.06.012.
4. Dellon ES, Gonsalves N, Hirano I, Furuta GT, Liacouras CA, Katzka DA. American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: Evidenced based approach to the diagnosis and management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). *Am J Gastroenterol.* 2013;108(5):679–92;quiz 693. DOI: 10.1038/ajg.2013.71.
5. Кайбышева В.О., Михалева Л.М., Никонов Е.Л., Шаповалыню С.Г. Эпидемиология, этиология и патогенез эозинофильного эзофагита. Новейшие данные. Доказательная гастроэнтерология. 2019;8(2):50–72. DOI: 10.17116/dokgastro2019802150. Kaibysheva VO, Mikhaleva LM, Nikonov EL, Shapovalyants SG. Epidemiology, etiology and pathogenesis of eosinophilic esophagitis. The latest data. *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology = Dokazatel'naya gastroenterologiya.* 2019;8(2):50–72 (In Russ.). DOI: 10.17116/dokgastro2019802150.
6. Кайбышева В.О., Михалева Л.М. Эозинофильный эзофагит. Москва: Медиа Сфера, 2021. 104 с. Kaibysheva VO, Mikhaleva LM. Eosinophilic esophagitis. Moscow: Media Sfera, 2021. 104 p. (In Russ.).
7. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA et al. Eosinophilic esophagitis: Updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(1):3–20.e6;quiz 21–2. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.02.040.
8. Dellon ES, Liacouras CA. Advances in clinical management of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2014;147(6):1238–54. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.07.055.
9. Assa'ad AH, Putnam PE, Collins MH, Akers RM, Jameson SC, Kirby CL et al. Pediatric patients with eosinophilic esophagitis: An 8-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(3):731–8. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.10.044.
10. Kapel RC, Miller JK, Torres C, Aksoy S, Lash R, Katzka DA. Eosinophilic esophagitis: A prevalent disease in the United States that affects all age groups. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1316–21. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.016.
11. Reed CC, Dellon ES. Eosinophilic esophagitis. *Med Clin North Am.* 2019;103(1):29–42. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.08.009.
12. Кайбышева В.О., Кашин С.В., Михалева Л.М., Видяева Н.С., Куваев Р.О., Галкова З.В. и др. Эозинофильный эзофагит: современный взгляд на проблему и собственные клинические наблюдения. Доказательная гастроэнтерология. 2019;8(1):58–83. DOI: 10.17116/dokgastro2019801158. Kaibysheva VO, Kashin SV, Mikhaleva LM, Vidyayeva NS, Kuvayev RO, Galkova ZV et al. Eosinophilic esophagitis: current view on the problem and own clinical observations. *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology = Dokazatel'naya gastroenterologiya.* 2019;8(1):58–83 (In Russ.). DOI: 10.17116/dokgastro2019801158.
13. Richter JE, Rubenstein JH. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.* 2018;154(2):267–76. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.07.045.
14. Biedermann L, Straumann A, Greuter T, Schreiner P. Eosinophilic esophagitis – established facts and new horizons. *Semin Immunopathol.* 2021;43(3):319–35. DOI: 10.1007/s00281-021-00855-y.
15. Khan S, Guo X, Liu T, Iqbal M, Jiang K, Zhu L et al. An update on eosinophilic esophagitis: Etiological factors, coexisting diseases, and complications. *Digestion.* 2021;102(3):342–56. DOI: 10.1159/000508191.
16. Winter HS, Madara JL, Stafford RJ, Grand RJ, Quinlan JE, Goldman H. Intraepithelial eosinophils: A new diagnostic criterion for reflux esophagitis. *Gastroenterology.* 1982;83(4):818–23. PMID: 7106512.
17. Attwood SE, Smyrk TC, Demeester TR, Jones JB. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. *Dig Dis Sci.* 1993;38(1):109–16. DOI: 10.1007/BF01296781.
18. Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, Gupta SK, Justinich C, Putnam PE et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: A systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology.* 2007;133(4):1342–63. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.08.017.

19. *Molina-Infante J, Ferrando-Lamana L, Ripoll C, Hernandez-Alonso M, Mateos JM, Fernandez-Bermejo M et al.* Esophageal eosinophilic infiltration responds to proton pump inhibition in most adults. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(2):110–7. DOI: 10.1016/j.cgh.2010.09.019.
20. *Cotton CC, Betancourt R, Randall C, Perjar I, Bookhout C, Woosley JT et al.* A model using clinical and endoscopic characteristics identifies patients at risk for eosinophilic esophagitis according to updated diagnostic guidelines. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(9):1824–34.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.06.068.
21. *Spechler SJ, Genta RM, Souza RF.* Thoughts on the complex relationship between gastroesophageal reflux disease and eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(6):1301–6. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01179.x.
22. *Pinto-Sanchez MI, Silvester JA, Leibold B, Leffler DA, Anderson RP, Therrien A et al.* Society for the Study of Celiac Disease position statement on gaps and opportunities in coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(12):875–84. DOI: 10.1038/s41575-021-00511-8.
23. *Jansson-Knodell CL, Hujoel IA, West CP, Taneja V, Prokop LJ, Rubio-Tapia A et al.* Sex difference in celiac disease in undiagnosed populations: A systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(10):1954–68.e13. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.11.013.
24. *Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C et al.* Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Med.* 2019;17(1):142. DOI: 10.1186/s12916-019-1380-z.
25. *Shalom G, Kridin K, Raviv KO, Freud T, Comaneshter D, Friedland R et al.* Atopic dermatitis and celiac disease: A cross-sectional study of 116,816 patients. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21(1):133–8. DOI: 10.1007/s40257-019-00474-2.
26. *Kauppi S, Jokelainen J, Timonen M, Tasanen K, Huilaja L.* Atopic dermatitis is associated with dermatitis herpetiformis and celiac disease in children. *J Invest Dermatol.* 2021;141(1):191–3.e2. DOI: 10.1016/j.jid.2020.05.091.
27. *Shah A, McGreal N, Li B, Kagalwalla AF, Guandalini S.* Celiac disease in association with eosinophilic esophagitis: Case series of six patients from two centers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43(4):E24–5. DOI: 10.1097/00005176-200610000-00062.
28. *Kagalwalla AF, Shah A, Ritz S, Melin-Aldana H, Li BU.* Cow's milk protein-induced eosinophilic esophagitis in a child with gluten-sensitive enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44(3):386–8. DOI: 10.1097/01.mpg.0000243430.32087.5c.
29. *Verzegnassi F, Bua J, De Angelis P, Dall'Oglio L, Di Leo G, Ventura A.* Eosinophilic oesophagitis and coeliac disease: is it just a casual association? *Gut* 2007;56(7):1029–30. DOI: 10.1136/gut.2006.117986.
30. *Lucendo AJ, Arias Á, Tenias JM.* Systematic review: The association between eosinophilic oesophagitis and coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(5):422–34. DOI: 10.1111/apt.12859.
31. *Ludvigsson JF, Aro P, Walker MM, Vieth M, Agréus L, Talley NJ et al.* Celiac disease, eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease, an adult population-based study. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48(7):808–14. DOI: 10.3109/00365521.2013.792389.
32. *Hommeida S, Alsawas M, Murad MH, Katzka DA, Grothe RM, Absah I.* The association between celiac disease and eosinophilic esophagitis: Mayo experience and meta-analysis of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(1):58–63. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001499.
33. *Ari A, Morgenstern S, Chodick G, Matar M, Silbermintz A, Assa A et al.* Oesophageal eosinophilia in children with coeliac disease. *Arch Dis Child.* 2017;102(9):825–9. DOI: 10.1136/archdischild-2016-311944.
34. *Abuquteish D, Putra J.* Upper gastrointestinal tract involvement of pediatric inflammatory bowel disease: A pathological review. *World J Gastroenterol.* 2019;25(16):1928–35. DOI: 10.3748/wjg.v25.i16.1928.
35. *Kővári B, Pai RK.* Upper gastrointestinal tract involvement in inflammatory Bowel diseases: Histologic clues and pitfalls. *Adv Anat Pathol.* 2022;29(1):2–14. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000311.
36. *Fan YC, Steele D, Kochar B, Arsene D, Long MD, Dellon ES.* Increased prevalence of esophageal eosinophilia in patients with inflammatory Bowel disease. *Inflamm Intest Dis.* 2019;3(4):180–6. DOI: 10.1159/000497236.
37. *Limketkai BN, Shah SC, Hirano I, Bellaguarda E, Colombel JF.* Epidemiology and implications of concurrent diagnosis of eosinophilic oesophagitis and IBD based on a prospective population-based analysis. *Gut.* 2019;68(12):2152–60. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-318074.
38. *Sonnenberg A, Turner KO, Genta RM.* Comorbid occurrence of eosinophilic esophagitis and inflammatory Bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(3):613–5.e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.02.015.
39. *Truskaite K, Dlugosz A.* Prevalence of eosinophilic esophagitis and lymphocytic esophagitis in adults with esophageal food bolus impaction. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:9303858. DOI: 10.1155/2016/9303858.
40. *Islam S, Lee A, Lampe G.* Lymphocytic esophagitis: An Australian (Queensland) case series of a newly recognized mimic of eosinophilic esophagitis. *JGH Open.* 2019;3(5):400–4. DOI: 10.1002/jgh3.12175.
41. *Rubio CA, Ichiya T, Schmidt PT.* Lymphocytic oesophagitis, eosinophilic esophagitis and compound lymphocytic-eosinophilic oesophagitis I: Histological and immunohistochemical findings. *J Clin Pathol.* 2017;70(3):208–16. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-203782.
42. *Haque S, Genta RM.* Lymphocytic oesophagitis: Clinicopathological aspects of an emerging condition. *Gut.* 2012;61(8):1108–14. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301014.
43. *Cohen S, Saxena A, Waljee AK, Piraka C, Purdy J, Appelman H et al.* Lymphocytic esophagitis: A diagnosis of increasing frequency. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(10):828–32. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182500de8.
44. *Rouphael C, Gordon IO, Thota PN.* Lymphocytic esophagitis: Still an enigma a decade later. *World J Gastroenterol.* 2017;23(6):949–56. DOI: 10.3748/wjg.v23.i6.949.
45. *Purdy JK, Appelman HD, Golembeski CP, McKenna BJ.* Lymphocytic esophagitis: A chronic or recurring pattern of esophagitis resembling allergic contact dermatitis. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(4):508–13. DOI: 10.1309/D3PCF6D6YYMQRX9A.



46. Squires KA, Cameron DJ, Oliver M, da Fonseca Junqueira JC. Herpes simplex and eosinophilic oesophagitis: The chicken or the egg? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(2):246–50. DOI: 10.1097/MPG.0b013e31817b5b73.
47. Fritz J, Lerner D, Suchi M. Herpes simplex virus esophagitis in immunocompetent children: A harbinger of eosinophilic esophagitis? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(4):609–13. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001748.
48. Zimmermann D, Cribblez DH, Dellon ES, Busmann C, Pfeifer D, Froh M et al. Acute herpes simplex viral esophagitis occurring in 5 immunocompetent individuals with eosinophilic esophagitis. *ACG Case Rep J.* 2016;3(3):165–8. DOI: 10.14309/crj.2016.38.
49. Marella HK, Kothadia JP, Saleem N, Ali B, Abdel-Aziz Y, Mupparaju V et al. A patient with eosinophilic esophagitis and herpes simplex esophagitis: A case report and literature review. *Case Rep Gastrointest Med.* 2021;2021:5519635. DOI: 10.1155/2021/5519635.
50. Frieling T, Heise J, Kreysel C, Blank M, Hemmerlein B, Beccu L et al. Eosinophilic esophagitis and achalasia – just a coincidence? *Z Gastroenterol.* 2019;57(2):151–5. DOI: 10.1055/a-0808-5043.
51. Martín Martín L, Santander C, Lopez Martín MC, Espinoza-Ríos J, Chavarría-Herbozo C, Gisbert JP et al. Esophageal motor abnormalities in eosinophilic esophagitis identified by high-resolution manometry. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(9):1447–50. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06770.x.
52. Nennstiel S, Bajbouj M, Becker V, Slotta-Huspenina J, Wagenpfeil S, Schmid RM et al. High-resolution manometry in patients with eosinophilic esophagitis under topical steroid therapy – a prospective observational study (HIMEOS-study). *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(4):599–607. DOI: 10.1111/nmo.12753.
53. Ghisa M, Laserra G, Marabotto E, Ziola S, Tolone S, de Bortoli N et al. Achalasia and obstructive motor disorders are not uncommon in patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(8):1554–63. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.07.056.
54. Frieling T, Kreysel C, Blank M, Mülle D, Euler P, Melchior I. Not always eosinophilic esophagitis – intramural pseudodiverticulosis of the esophagus – a case report and literature review. *Z Gastroenterol.* 2020;58(12):1201–7. DOI: 10.1055/a-1288-1521.
55. Hentschel F, Lüth S. Clinical and endoscopic characteristics of diffuse esophageal intramural pseudo-diverticulosis. *Esophagus.* 2020;17(4):492–501. DOI: 10.1007/s10388-020-00729-6.
56. Scaffidi MA, Garg A, Ro B, Wang C, Yang TT, Plener IS et al. Esophageal intramural pseudodiverticulosis and concomitant eosinophilic esophagitis: A case series. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2016;2016:1761874. DOI: 10.1155/2016/1761874.
57. Kathi PR, Tama M, Thammineni N, Ehrnpreis M. Pseudodiverticulosis: A rare presentation of eosinophilic esophagitis. *Clin J Gastroenterol.* 2020;13(2):170–2. DOI: 10.1007/s12328-019-01044-z.
58. Lecouffe-Desprets M, Groh M, Bour B, Le Jeunne C, Puéchal X. Eosinophilic gastrointestinal disorders associated with autoimmune connective tissue disease. *Joint Bone Spine.* 2016;83(5):479–84. DOI: 10.1016/j.jbspin.2015.11.006.
59. Sandhya P, Danda D, Mathew J, Kurian S, Ramakrishna BS. Eosinophilic esophagitis and pharyngitis presenting as mass lesion in a patient with inactive rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2012;18(1):33–5. DOI: 10.1097/RHU.0b013e31823e6b54.
60. Xue Z, Miller TL, Abramson L, Thakkar KP, Ketchem CJ, Reddy S et al. Association of eosinophilic esophagitis with autoimmune and connective tissue disorders, and the impact on treatment response. *Dis Esophagus.* 2022;36(1):doac043. DOI: 10.1093/dote/doac043.
61. Abonia JP, Wen T, Stucke EM, Grotjan T, Griffith MS, Kemme KA et al. High prevalence of eosinophilic esophagitis in patients with inherited connective tissue disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):378–86. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.02.030.
62. Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB. ACG clinical guideline: Diagnosis and management of Barrett’s esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(1):30–50;quiz 51. DOI: 10.1038/ajg.2015.322.
63. Conteduca V, Sansonno D, Ingravallo G, Marangi S, Russi S, Lauletta G et al. Barrett’s esophagus and esophageal cancer: An overview. *Int J Oncol.* 2012;41(2):414–24. DOI: 10.3892/ijo.2012.1481.
64. Ness-Jensen E. Epidemiology and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 2022;57(8):891–5. DOI: 10.1080/00365521.2022.2042594.
65. Phoa KN, van Vilsteren FG, Weusten BL, Bisschops R, Schoon EJ, Ragnath K et al. Radiofrequency ablation vs endoscopic surveillance for patients with Barrett esophagus and low-grade dysplasia: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;311(12):1209–17. DOI: 10.1001/jama.2014.2511.
66. Shaheen NJ, Sharma P, Overholt BF, Wolfsen HC, Sampliner RE, Wang KK et al. Radiofrequency ablation in Barrett’s esophagus with dysplasia. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2277–88. DOI: 10.1056/NEJMoa0808145.
67. Qumseya BJ, Wani S, Desai M, Qumseya A, Bain P, Sharma P et al. Adverse events after radiofrequency ablation in patients with Barrett’s esophagus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(8):1086–95.e6. DOI: 10.1016/j.cgh.2016.04.001.
68. Villa N, El-Serag HB, Younes M, Ertan A. Esophageal eosinophilia after radiofrequency ablation for Barrett’s esophagus. *Dis Esophagus.* 2013;26(7):674–7. DOI: 10.1111/dote.12033.
69. Halsey KD, Arora M, Bulsiewicz WJ, Heath J, Petullo B, Madanick RD et al. Eosinophilic infiltration of the esophagus following endoscopic ablation of Barrett’s neoplasia. *Dis Esophagus.* 2013;26(2):113–6. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2012.01330.x.
70. Owens VL, Katzka DA, Lutzke LS, Wang KK, Smyrk TC. Endoscopic ablative therapy for Barrett’s esophagus: A potential cause of eosinophilic esophagitis. *Dis Esophagus.* 2012;25(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2011.01214.x.
71. Aceves SS, Alexander JA, Baron TH, Bredenoord AJ, Day L, Dellon ES et al. Endoscopic approach to eosinophilic esophagitis: American Society for Gastrointestinal Endoscopy Consensus Conference. *Gastrointest Endosc.* 2022;96(4):576–92.e1. DOI: 10.1016/j.gie.2022.05.013.
72. Dhar A, Haboubi HN, Attwood SE, Auth MKH, Dunn JM, Sweis R et al. British Society of Gastroenterology (BSG) and British Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (BSPGHAN) joint consensus guidelines on the diagnosis and management of eosinophilic oesophagitis in children and adults. *Gut.* 2022;71(8):1459–87. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327326.

73. O'Shea KM, Aceves SS, Dellon ES, Gupta SK, Spergel JM, Furuta GT et al. Pathophysiology of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*. 2018;154(2):333–45. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.06.065.
74. Zhernov YV, Vysochanskaya SO, Sukhov VA, Zaostrvtseva OK, Gorshenin DS, Sidorova EA et al. Molecular mechanisms of eosinophilic esophagitis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13183. DOI: 10.3390/ijms222413183.
75. D'Alessandro A, Esposito D, Pesce M, Cuomo R, De Palma GD, Sarnelli G. Eosinophilic esophagitis: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6(4):150–8. DOI: 10.4291/wjgp.v6.i4.150.
76. Orlando RC. The integrity of the esophageal mucosa. Balance between offensive and defensive mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(6):873–82. DOI: 10.1016/j.bpg.2010.08.008.
77. Litosh VA, Rochman M, Rymer JK, Porollo A, Kottyan LC, Rothenberg ME. Calpain-14 and its association with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1762–71.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.09.027.
78. Aceves SS, Newbury RO, Dohil R, Bastian JF, Broide DH. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):206–12. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.10.016.
79. Collins MH, Martin LJ, Alexander ES, Boyd JT, Sheridan R, He H et al. Newly developed and validated eosinophilic esophagitis histology scoring system and evidence that it outperforms peak eosinophil count for disease diagnosis and monitoring. *Dis Esophagus*. 2017;30(3):1–8. DOI: 10.1111/dote.12470.

### Информация об авторах

Ксения Сергеевна Масленкина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Евгений Николаевич Мотылев – аспирант НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Михаил Юрьевич Гущин – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Валерия Олеговна Кайбышева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории хирургической гастроэнтерологии и эндоскопии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Дмитрий Андреевич Атякшин – доктор медицинских наук, профессор, директор научно-образовательного ресурсного центра «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» РУДН им. Патриса Лумумбы.

Яна Юрьевна Кудрявцева – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы.

Георгий Юрьевич Кудрявцев – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы.

### Authors information

Ksenia S. Maslenkina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-8083-9428>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of 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>

Eugeny N. Motylev – Postgraduate Student, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-9453-3515>

Mikhail U. Gushchin – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-1041-8561>

Valeria O. Kaibysheva – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Research Laboratory of Surgical Gastroenterology and Endoscopy, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-0114-3700>

Dmitry A. Atyakshin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Research and Educational Resource Centre for Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis Innovative Technologies, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0002-8347-4556>

Yana Y. Kudryavtseva – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Pathology Department, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0002-7218-0798>

Georgy Y. Kudryavtsev – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Pathology Department, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0001-7921-9758>

## Нейроэндокринные опухоли желудка у пациентов с аутоиммунным гастритом

А.С. Тертычный<sup>1</sup>, М.В. Мнихович<sup>2</sup>, Д.П. Нагорная<sup>1</sup>, П.В. Павлов<sup>3</sup>,  
А.П. Кирюхин<sup>3</sup>, А.А. Федоренко<sup>3</sup>, А.А. Саха<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт клинической морфологии и цифровой патологии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 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> Отделение диагностической и лечебной эндоскопии университетской клинической больницы № 2, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* В настоящее время высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли (НЭО) желудка (карциноидные опухоли желудка) стали выявлять намного чаще, чем раньше, – с десятикратным увеличением за последние 30–35 лет, и их прогноз за это время значительно улучшился. К 1-му типу НЭО желудка относится от 70 до 80% его нейроэндокринных новообразований. Они связаны с хроническим атрофическим аутоиммунным гастритом (АИГ) и гиперплазией энтерохромаффиноподобных (enterochromaffin-like, ECL) клеток.

*Материалы и методы.* Всего за 5 лет наблюдения – с 2017 по 2022 год – по базе данных ЦПАО клинического центра Сеченовского университета АИГ диагностирован у 155 пациентов. В настоящее исследование включены 34 случая, в которых было доказано наличие АИГ и опухоли были отнесены к НЭО желудка 1-го типа. Возраст пациентов варьировал от 37 до 75 лет (в среднем 57 лет).

*Результаты.* По результатам проведенного нами исследования НЭО 1-го типа чаще наблюдаются у женщин в возрасте 50–60 лет и представлены в 77% случаев в виде многоочаговых полиповидных новообразований слизистой оболочки (<10 мм) в теле и/или дне желудка. Проллиферативная активность (Ki-67, индекс MIB1) была меньше 3%. НЭО 1-го типа характеризовались минимальной инвазивностью: 74% были ограничены слизистой оболочкой и 26% инвазировали подслизистую основу. Опухоли стали случайной находкой до постановки диагноза «аутоиммунный гастрит» в 25 случаях, и в девяти случаях НЭО были диагностированы при ранее уже подтвержденном диагнозе. Размеры их варьировали от 0,15 до 1,8 см и в среднем составили 0,8 мм. Распространенность НЭО желудка 1-го типа у пациентов с АИГ по данным нашего исследования равнялась 22% (34 из 155 пациентов с АИГ), если учитывать только новообразования, размеры которых превышают 0,5 см, и исключить случаи дисплазии, общее число случаев в нашем исследовании составило 15 (9,7%).

*Заключение.* У пациентов с АИГ в измененной атрофической слизистой оболочке тела желудка следует стремиться выявлять гиперпластические и в особенности диспластические изменения ECL клеток, свидетельствующие о повышенном риске развития НЭО, требующие адекватного эндоскопического лечения и/или наблюдения за пациентами. Пациенты с НЭО желудка 1-го типа диаметром 1 см или меньше при отсутствии таких факторов риска как инфильтрация мышечной стенки, высокий индекс пролиферации (>3%) и/или ангиоинвазия могут быть оперированы малоинвазивными щадящими методами с помощью гибкого эндоскопа, и/или их ведут консервативно (при регулярном инструментально-лабораторном наблюдении).

**Ключевые слова:** нейроэндокринная опухоль, карциноид, желудок, дисплазия, аутоиммунный гастрит

**Для корреспонденции:** Александр Семенович Тертычный. E-mail: atertychnyy@gmail.com

**Для цитирования:** Тертычный А.С., Мнихович М.В., Нагорная Д.П., Павлов П.В., Кирюхин А.П., Федоренко А.А., Саха А.А. Нейроэндокринные опухоли желудка у пациентов с аутоиммунным гастритом. Клини. эксп. морфология. 2023;12(3):19–27. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.19-27.

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

**Статья поступила** 01.08.2022. **Получена после рецензирования** 25.08.2022. **Принята в печать** 15.09.2022.

## Gastric neuroendocrine tumors in patients with autoimmune gastritis

A.S. Tertychnyy<sup>1</sup>, M.V. Mnikhovich<sup>2</sup>, D.P. Nagornaya<sup>1</sup>, P.V. Pavlov<sup>3</sup>,  
A.P. Kiryukhin<sup>3</sup>, A.A. Fedorenko<sup>3</sup>, A.A. Sakha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>2</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Center of Surgery", Moscow, Russia

<sup>3</sup> Department of Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, University Clinical Hospital No. 2, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Today, well-differentiated gastric neuroendocrine tumors (GNETs)—previously known as carcinoids—have been detected 10 times more frequently in the last 30–35 years, and their prognosis has significantly improved over this time. Type 1 GNETs includes 70 to 80% of gastric neuroendocrine neoplasms and is associated with chronic atrophic autoimmune gastritis (AIH) and enterochromaffin-like (ECL) cell hyperplasia.

**Materials and methods.** During a 5-year follow-up period from 2017 to 2022, AIH was diagnosed in 155 patients according to the database of the Clinical Center of Sechenov University. This study included 34 cases in which the presence of AIH was proven and the tumors were classified as type 1 GNETs. The age of the patients ranged from 37 to 75 years, the median one being 57 years.

**Results.** Type 1 GNETs was more often observed in women aged 50–60 years and in 77% of cases, presented multifocal polypoid neoplasms of the mucous membrane (<10 mm) in the gastric body and/or fundus. All tumors were well-differentiated and structured in solid and trabecular-tubular patterns. Proliferative activity (Ki-67, MIB-1 index) was below 3%. Seventy-four percent of type 1 GNETs were limited to the mucosa and 26% invaded the submucosa. Tumors were detected incidentally before AIH was diagnosed in 25 cases. GNETs diagnoses were made with previously confirmed AIH in 9 cases. The GNET sizes varied from 0.15 to 1.8 cm (average 0.8 mm). The prevalence of type 1 GNETs in patients with AIH was 22% (34 out of 155 patients having AIH). We considered only neoplasms larger than 0.5 cm and excluded cases of dysplasia. The total number of cases was 15 (9.7%).

**Conclusion.** In patients with AIH in the altered atrophic mucosa of the gastric body, one should strive to identify hyperplastic and especially dysplastic changes in ECL cells indicating an increased risk of developing GNETs that require adequate endoscopic treatment and/or follow-up. Patients with type 1 GNETs of 1 cm or less in diameter and no risk factors such as muscle wall infiltration, high proliferation index (>3%), and/or blood vessel invasion, can be operated on with minimally invasive sparing techniques and a flexible endoscope and/or conservatively in regular instrumental and laboratory monitoring.

**Keywords:** neuroendocrine tumor, carcinoid, stomach, dysplasia, autoimmune gastritis

**Corresponding author:** Alexander S. Tertychnyy. E-mail: atertychnyy@gmail.com

**For citation:** Tertychnyy A.S., Mnikhovich M.V., Nagornaya D.P., Pavlov P.V., Kiryukhin A.P., Fedorenko A.A., Sakha A.A. Gastric neuroendocrine tumors in patients with autoimmune gastritis. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):19–27 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.19-27.

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

**Received 01.08.2022. Received in revised form 25.08.2022. Accepted 15.09.2022.**

### Введение

В настоящее время высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли (НЭО) желудка (карциноидные опухоли желудка) стали диагностировать намного чаще, чем раньше, — с десятикратным увеличением за последние 30–35 лет, и их прогноз за это время значительно улучшился [1–4]. Сегодня большинство карциноидов желудка выявляют на ранней стадии. В соответствии с классификацией ВОЗ 5-го пересмотра было предложено выделять три типа желудочных НЭО, и распознавание каждого типа важно для определения диагностического подхода и лечения [5, 6].

Сейчас наиболее распространенные НЭО желудка 1-го типа обычно диагностируют при диаметре опу-

холи менее 2,0 см. Эти небольшие новообразования лишь изредка вызывают специфические симптомы; в большинстве случаев они обнаруживаются случайно во время видеогастроскопии, которую проводят по другой причине, например при анемии, симптомах рефлюкса или неспецифических абдоминальных симптомах [7].

К 1-му типу НЭО желудка относится от 70 до 80% его нейроэндокринных новообразований. Они связаны с хроническим атрофическим аутоиммунным гастритом (АИГ) и гиперплазией enterochromaffin-like (ECL) клеток [8]. Как иммуногистохимически, так и ультраструктурно в теле желудка могут быть идентифицированы ECL клетки и отдельные enterochromaffin (серотониновые)

или соматостатиновые клетки. Помимо синаптофизина и хромогранина А ECL клетки также экспрессируют везикулярный переносчик моноаминов 2 (VMAT2) и часто альфа-хорионический гонадотропин человека (альфа-ХГЧ) [9].

По данным отечественной и зарубежной литературы, клинический синдром гиперсекреции и проявлений карциноидного синдрома при НЭО желудка 1-го типа не описан и о случаях смерти от НЭО желудка 1-го типа не сообщалось. 5- и 10-летняя выживаемость пациентов не отличается от таковой в общей популяции [1, 7, 8].

Цель исследования – провести анализ морфологических особенностей нейроэндокринных поражений желудка 1-го типа, которые были диагностированы у пациентов с АИГ, на основании оценки морфологических изменений в слизистой оболочке биоптатов, взятых во время проведения эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта (видеогастроскопия) или полученных в результате эндоскопических резекций.

## Материалы и методы

Всего за 5-летний период наблюдения, с 2017 по 2022 год, по базе данных ЦПАО клинического центра Сеченовского университета АИГ был диагностирован у 155 пациентов. Возраст пациентов варьировал от 34 до 83 лет и в среднем составил 62,1 года. Соотношение мужчин и женщин было 1:4.

В настоящее исследование включено 34 случая, в которых было доказано наличие АИГ и опухоли отнесены к НЭО желудка 1-го типа.

Дополнительно проводился забор материала по модифицированному протоколу OLGА/сиднейскому протоколу, включавшему обязательное взятие двух биоптатов из антрального отдела и двух из тела по большой и малой кривизне желудка.

Материал биоптатов обрабатывали по общепринятой методике. Для диагностики НЭО использовали стандартную панель антител, включавшую антитела к хромогранину А (клон 5HT, RTU, Leica Microsystems, Германия), синаптофизину (клон 5A, RTU, Leica Microsystems, Германия) и Ki67 (клон MM1, RTU, Leica Microsystems, Германия). Иммуногистохимическое окрашивание препаратов выполнялось на автоматическом иммуноштейнере Bond-Max (Leica Microsystems, Германия).

Обработку полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и описательной статистики в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Результаты представляли в виде абсолютных чисел и процентов, медианы и квартилей.

## Результаты

Возраст пациентов варьировал от 37 до 75 лет. Медиана возраста составила 57 лет. Среди пациен-

тов было 40% мужчин и 60% женщин (соотношение 1:1,5). Полученные возрастные показатели были близки к показателям группы АИГ, что вполне предсказуемо, а по полу различия оказались существенными.

При первоначальном поступлении материала после проведения эндоскопического исследования диагноз «нейроэндокринная опухоль» был заподозрен в подавляющем числе наблюдений (30 из 34, или 88% случаев). В части случаев при эндоскопическом исследовании диагностировано поражение, обозначенное как «полип» или «гиперплазия».

Клинико-морфологические характеристики пациентов с НЭО желудка 1-го типа представлены в таблице.

Таблица | Table

Клинико-морфологические характеристики пациентов с нейроэндокринными опухолями желудка 1-го типа | Clinical and morphological features in patients with type 1 GNETs

Характеристика   Feature	Значение   Value
Возраст, лет, Me (Q1 : Q3)   Age, years, Me (Q1 : Q3)	57 (49,5; 60,5)
Соотношение по полу, %   Sex ratio, %	Мужчины: женщины/ 40:60   Male:female/ 40:60
<i>Локализация   Location</i>	
Тело и дно желудка   Gastric body and fundus	28 (82,35%)
Субкардиальный отдел   Subcardia	3 (8,82%)
Граница свода и тела   Fundus/body border	3 (8,82%)
<i>Число опухолей   Number of GNETs</i>	
Общее   Total	34 (100%)
• одиночные   single	5 (14,71%)
• множественные   multiple	29 (85,29%)
Степень дифференцировки   Grade	G1 Ki67<3%
<i>Стадия   Stage</i>	
T1a	23 (67,65%)
T1b	11 (32,35%)
<i>Размеры   Sizes</i>	
НЭО ≥1,0 см≤2,0 см   NET ≥1.0 cm≤2.0 cm	5 (14,71%)
НЭО ≥0,5 см≤1,0 см   NET ≥0.5 cm≤1.0 cm	10 (29,41%)
Дисплазия/микрокарциноид ≥0,3 см≤0,5 см   Dysplasia/microcarcinoid ≥0.3 cm≤0.5 cm	15 (44,12%)
Дисплазия/микрокарциноид ≥0,15 см≤0,3 см   Dysplasia/microcarcinoid ≥0.15 cm≤0.3 cm	4 (11,76%)

Новообразования локализовались преимущественно в теле и дне желудка ( $n=28$ ), в субкардиальном отделе желудка ( $n=3$ ), на границе свода и тела желудка ( $n=3$ ). Одиночные опухоли были диагностированы в пяти случаях, множественные в 29. Опухоли явились случайной находкой до постановки диагноза «аутоиммунный гастрит» в 25 случаях, в девяти случаях НЭО были диагностированы при ранее уже подтвержденном диагнозе. Размеры их варьировали от 0,15 до 1,8 см и в среднем составили 0,8 мм.

Опухоли были заподозрены и в связи с их миниатюрным размером (менее 0,3 см) полностью удалены во время взятия биоптата в 23 из 34 наблюдений (77%), в остальных случаях выполнены эндоскопическая резекция слизистой оболочки холодной петлей или резекция слизистой оболочки с диссекцией в подслизистом слое.

Рецидив НЭО отмечен в пяти случаях. Тактика динамического наблюдения показала свою эффективность в случаях повторного удаления НЭО, размеры первичной опухоли которых были менее 2 см, а диаметр рецидивирующих опухолей не превышал 1 см.

При динамическом наблюдении пациентов с множественными неоплазиями при ранее подтвержденном диагнозе «нейроэндокринная опухоль» были выполнены аргоно-плазменная коагуляция с биопсией отдельных образований для дополнительного подтверждения диагноза.

В семи случаях при контрольных эндоскопических исследованиях со взятием биопсии из подозрительных участков морфологические признаки рецидива новообразований выявлены не были, однако динамическое наблюдение за этими пациентами продолжается по настоящее время.

Признаки метастатического поражения лимфатических узлов и печени при проведении визуальных методов диагностики, а также признаки карциноидного синдрома по клиническим данным не отмечены ни в одном случае.

При морфологическом исследовании новообразования располагались в собственной пластинке слизистой оболочки в 25 случаях (74%), и в девяти случаях было отмечено проникновение неоплазии в подслизистый слой (26%).

Гистологически опухоли были высокодифференцированы, при этом не отмечалось доминирования строго определенного варианта морфологического строения, который варьировал от солидного до тубулярного. Наиболее вероятно это было связано со стадией прогрессирования диспластических поражений, которые чаще носили солидный характер, однако по мере увеличения размера появлялись трабекулярные, альвеолярные и тубулярные структуры (рис. 1, 2).

При проведении иммуногистохимического (ИГХ) исследования клетки НЭО демонстрировали позитивное окрашивание в реакциях с антителами к хромогра-

нину А и синаптофизину. В окружающей слизистой оболочке тела желудка изменения энтерохромаффиноподобных клеток (ECL) были ранжированы в соответствии с классификацией E. Solcia et al. [10]. Гиперпластические изменения были представлены диффузной, линейной, микронодулярной или аденоматозной гиперплазией и обнаруживались во всех исследованных случаях. Гиперплазированные нейроэндокринные клетки при линейной гиперплазии находились в тесной топографической связи с поврежденными нейроэндокринными клетками, узелки располагались отдельно в базальных отделах собственной пластинки слизистой оболочки (рис. 3). Наблюдались многослойные железы с линейной гиперплазией

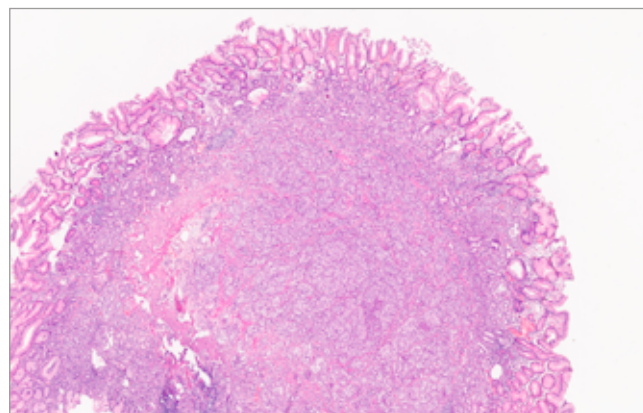


Рис. 1. Нейроэндокринная опухоль желудка 1-го типа. Материал эндоскопической резекции. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 1. Type 1 GNET. Endoscopic resection material. H&E stain,  $\times 100$

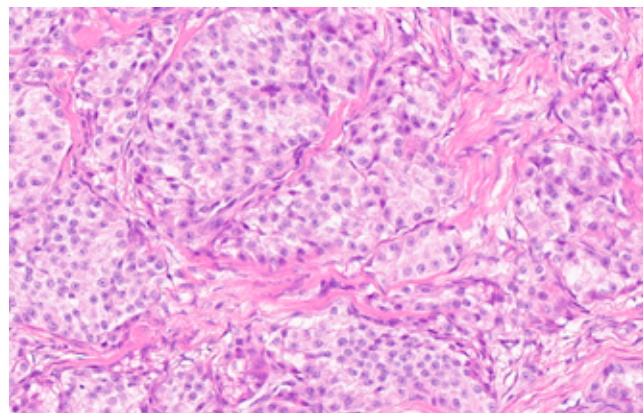


Рис. 2. Нейроэндокринная опухоль желудка 1-го типа. Тот же случай при большем увеличении, демонстрирующий гнезда мonomорфных опухолевых клеток без признаков атипии и митотической активности. Материал эндоскопической резекции. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

Fig. 2. Type 1 GNET. The same case at higher magnification showing nests of monomorphic tumor cells with no evidence of atypia or mitotic activity. Endoscopic resection material. H&E stain,  $\times 400$

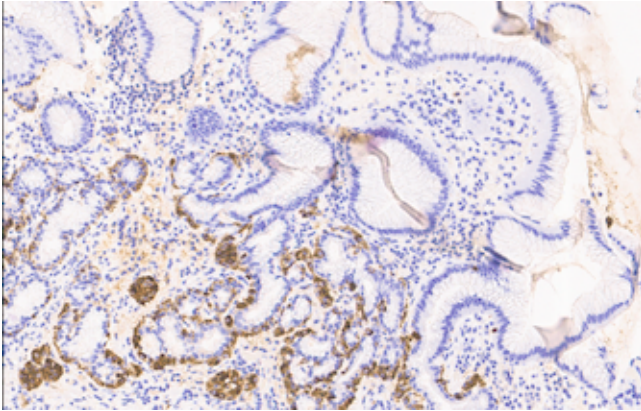


Рис. 3. Линейная и узелковая гиперплазия нейроэндокринных клеток. ИГХ реакция с антителами к хромогранину А,  $\times 200$

Fig. 3. Linear and nodular hyperplasia of neuroendocrine cells. IHC assay with chromogranin A,  $\times 200$

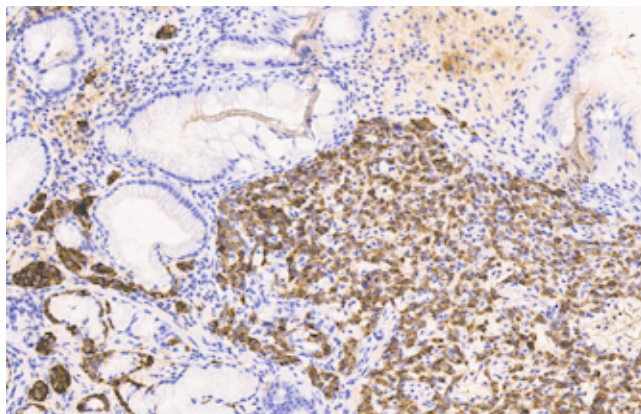


Рис. 5. Очаг дисплазии нейроэндокринных клеток твердого строения. В окружающей слизистой оболочке обнаруживается линейная и узелковая гиперплазия нейроэндокринных клеток. ИГХ реакция с антителами к хромогранину А,  $\times 200$

Fig. 5. Focal dysplasia of neuroendocrine cells of a solid structure. Linear and nodular hyperplasia of neuroendocrine cells is found in the surrounding mucosa. IHC assay with chromogranin A,  $\times 200$

хромогранин А-положительных нейроэндокринных клеток, покрывающих всю базальную мембрану, и содержащие нейроэндокринные клетки, образующие их центральный просветный слой (рис. 4). Диспластические поражения были обнаружены в 19 из 34 случаев (56%) и представлены в основном увеличенными или сливными микроузелками размерами более 150 мкм с признаками микроинвазии и узелками с новообразованной стромой (рис. 5, 6). Микроинвазивные поражения чаще локализовались в проекции регенераторной зоны на уровне незрелых гиперплазированных клеток шейки желез и характеризовались тяжами и скоплениями ECL клеток, которые демонстрировали микроинфильтрацию окружающей собственной пластинки слизистой оболочки (рис. 7).

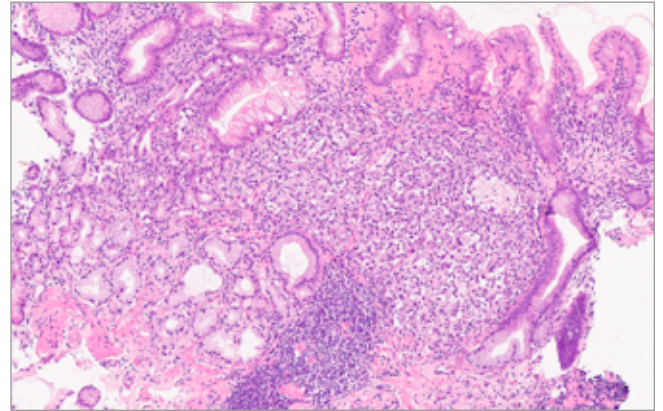


Рис. 4. Очаг дисплазии нейроэндокринных клеток твердого строения. Удален во время биопсии. В окружающей слизистой оболочке обнаруживаются признаки аутоиммунного гастрита в виде распространенной псевдопилорической метаплазии, гиперплазии эпителия ямок и формирования лимфоидного скопления. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 4. Focal dysplasia of neuroendocrine cells of a solid structure that was removed during biopsy. In the surrounding mucosa, signs of AIH are found in the form of widespread pseudopyloric metaplasia, hyperplasia of the epithelium of the pits, and the formation of lymphoid aggregate. H&E stain,  $\times 200$

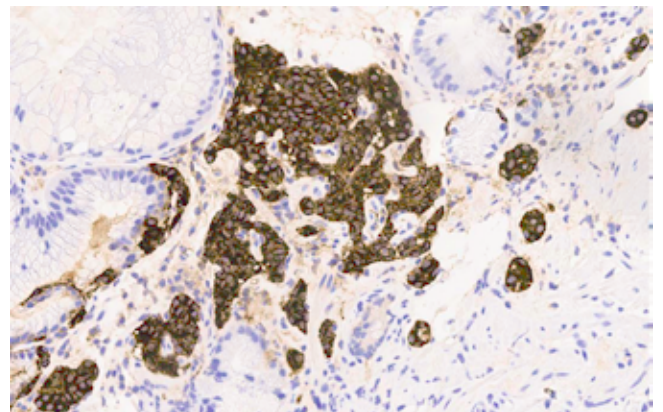
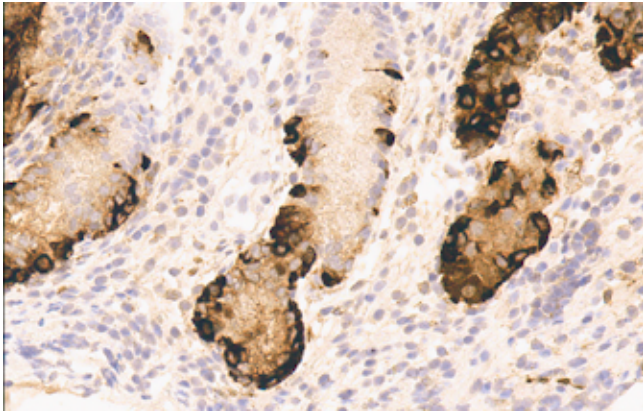


Рис. 6. Микроинвазивное нейроэндокринное поражение, расположенное в проекции регенераторной зоны на уровне шейки желез, в виде сливающихся скоплений и тяжей ECL клеток, которые демонстрируют микроинфильтрацию окружающей собственной пластинки слизистой оболочки. ИГХ реакция с антителами к хромогранину А,  $\times 250$

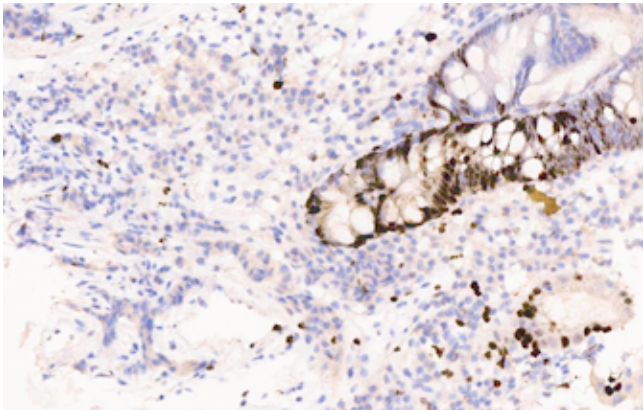
Fig. 6. Microinvasive neuroendocrine lesion located in the regenerative zone at the neck of the glands, forming confluent clusters and strands of ECL cells, which demonstrate microinfiltration of the surrounding lamina propria. IHC assay with chromogranin A,  $\times 250$

Окрашивание антителами к Ki-67 выявило стабильно низкую пролиферативную активность опухолевых клеток (рис. 8). Среди диспластических ECL клеток также наблюдали лишь единичные пролиферирующие клетки с окрашенными ядрами.



*Рис. 7.* Железы с линейной гиперплазией хромогранин А-положительных нейроэндокринных клеток, покрывающих всю базальную мембрану, и содержащие ненейроэндокринные клетки, образующие их центральный просветный слой. ИГХ реакция с антителами к хромогранину А, ×400

*Fig. 7.* Glands with linear hyperplasia of chromogranin A-positive neuroendocrine cells covering the entire basement membrane and containing non-neuroendocrine cells forming their central luminal layer. IHC assay with chromogranin A, ×400



*Рис. 8.* Низкая пролиферативная активность опухолевых клеток по сравнению с позитивным окрашиванием клеток эпителия в очагах кишечной метаплазии и в шеечном отделе желез. ИГХ реакция с антителами к Ki67, ×250

*Fig. 8.* Low proliferative activity of tumor cells compared to positive staining of epithelial cells in the intestinal metaplasia foci and in the hilum of glands. IHC assay with Ki67, ×250

## Обсуждение

Распространенность НЭО желудка 1-го типа у пациентов с АИГ по результатам крупных, в том числе международных, исследований составляет от 1% до 12,5% [11–13]. При сравнении данный показатель, полученный в ходе нашего анализа, 22% (34 из 155 пациентов с АИГ), несколько превосходит результаты, приведенные в зарубежной литературе, однако, если

учитывать только новообразования, размеры которых превышают 0,5 см, и исключить случаи дисплазии, общее число случаев в нашем исследовании – 15, что составляет 9,7%. Более высокий показатель заболеваемости в проведенном нами исследовании, с нашей точки зрения, ассоциирован со строгими критериями включения, исключения и невключения пациентов, используемыми другими авторами [11–13], особенно с учетом общего или субтотального уровня атрофии главных желез, комбинированного линейного и микронодулярного паттерна гиперплазии ECL клеток и более высокой распространенности дисплазии среди наших пациентов – 19/155 (12,3%) по сравнению с 7/214 (3,3%) по данным литературы [12].

Широкий диапазон показателей распространенности НЭО желудка 1-го типа может быть также объяснен разными условиями, в которых были отобраны пациенты, такими как профиль лечебного учреждения или симптомы/признаки проявления АИГ. Следует отметить, что АИГ может иметь широкий спектр клинических проявлений, таких как диспепсия, железодефицитная анемия или пернициозная анемия [14]. В частности, в обсервационном сравнительном исследовании, в котором оценивали заболеваемость и распространенность НЭО желудка 1-го типа, пернициозная анемия наблюдалась почти у 50% пациентов, в то время как предыдущие исследования включали исключительно пациентов с этим состоянием [13].

Долгосрочные наблюдательные исследования, оценивающие частоту НЭО желудка 1-го типа у пациентов с АИГ, немногочисленны [11, 13]. Так, по данным клинического исследования, в которое были включены пациенты с АИГ в течение 1463 человеко-лет, показатель годового уровня заболеваемости (человеко-год) для НЭО желудка 1-го типа составляет 0,4% [12]. В исследовании, проведенном в 1998 году, группа авторов сообщила о ежегодной заболеваемости в 2%, наблюдая только восемь новых случаев НЭО желудка 1-го типа на 416 пациенто-лет [13]. Финские исследователи [14] провели изучение 196 пациентов с пернициозной анемией, и после 1397 пациенто-лет в больничных регистрах было зарегистрировано всего два новых случая НЭО желудка 1-го типа. Принимая во внимание, что такое количество формально должно было соответствовать ежегодному показателю заболеваемости 0,1%, следует отметить, что в ходе данного исследования эзофагогастроуденоскопия была проведена всего у 70 пациентов (35,7%), в связи с чем представление об уровне заболеваемости можно получить лишь косвенным путем. Кроме того, несмотря на небольшие колебания зарегистрированных показателей заболеваемости, только у небольшой группы пациентов с АИГ развивается НЭО желудка 1-го типа, что свидетельствует о том, что для прогрессирования ECL клеток в НЭО желудка 1-го типа необходимы дополнительные факторы.

В нескольких исследованиях предпринимались попытки определить факторы риска, связанные



с развитием НЭО желудка 1-го типа. Обнаружены более высокие исходные уровни гастринина и хромогранина А у пациентов с НЭО желудка 1-го типа на фоне АИГ по сравнению с пациентами, у которых не было выявлено данное новообразование. Однако следует учесть, что у всех пациентов с АИГ высоки базовые значения хромогранина А и гастринина в плазме крови, поэтому эти маркеры имеют лишь ограниченное клиническое применение из-за низкой специфичности [15].

Принятым фактором риска НЭО желудка 1-го типа является наличие дисплазии ECL, которая часто связана с НЭО желудка 1-го типа. Это поражение считается истинным предшественником карциноида желудка и может представлять собой признак сопутствующего карциноидного поражения. В ходе своего исследования мы смогли проследить стадии трансформации, которые были представлены в виде последовательности нарастания гиперплазии: от простой до аденоматозной с последующим переходом в дисплазию, а затем и неоплазию.

Известно, что определяющим и ключевым критерием для обозначения данных новообразований, а также для выбора лечебной тактики является размер этих поражений.

По заключению, согласованному группой экспертов, разработавших первоначальную классификацию нейроэндокринных поражений желудка, любое эндокринное поражение более 500 мкм, которое может привести к эндоскопически обнаруживаемым изменениям слизистой оболочки, может рассматриваться как НЭО [16].

Исходя из этого постулата, нас заинтересовал вопрос, как называть неоплазии, которые имеют размеры менее 500 мкм (0,5 см). Если для НЭО легких применяется термин «опухольки» (tumoretts), то в желудке неоплазии менее 500 мкм получили обозначение «дисплазия» [16].

Анализируя семантические значения данных терминов, мы столкнулись с рядом, по нашему мнению, серьезных несоответствий. Приведенный ранее термин «дисплазия» не относится к дисплазии эпителия, но может быть ошибочно отождествлен с дисплазией эпителиальных клеток, которая, как известно, ассоциирована с развитием рака желудка кишечного типа и включена в каскад Корреа стадийного течения патологического процесса из метаплазии через дисплазию в карциному. Возможно, по этой причине данный термин не нашел широкого применения в повседневной практике морфологов.

Дополнительным важным критерием, с нашей точки зрения, является возможность визуализировать поражение при проведении эндоскопического исследования. Следует подчеркнуть, что в связи с высоким уровнем разрешения эндоскопической аппаратуры в нашем исследовании врачи-эндоскописты смогли диагностировать неоплазии, размеры которых не превышали 0,2 см, поэтому в своих морфологических заключениях

при наличии эндоскопически визуализируемых поражений желудка, диаметр которых не превышал 0,5 см, мы считали допустимым использовать термин «микрокарциноид желудка 1-го типа». Дополнительно для этих образований мы также хотели предложить рассмотреть возможность использования альтернативного термина «нейроэндокринное поражение», который в последнее время распространен применительно к патологии желудочно-кишечного тракта (в частности, для обозначения сидячего зубчатого полипа/аденомы, получившего название «сидячее зубчатое поражение») [17].

Следует отметить, что прецизионная оценка гиперпластических линейных и микронодулярных изменений в ECL клетках показала значительно более высокие значения у пациентов с дисплазией или неоплазией. Так, отчетливое увеличение риска дисплазии и НЭО наблюдалось у пациентов с шестью и более гиперпластическими линейными очагами на миллиметр слизистой оболочки. Таким образом, как дисплазия (наличие/отсутствие), так и тяжесть гиперплазии, с нашей точки зрения, должны быть добавлены в качестве факторов риска развития НЭО и учитываться при выборе пациентов для эндоскопического и гистологического наблюдения. Тем не менее следует отметить, что линейная гиперплазия по результатам проведенного нами исследования обнаруживалась во всех случаях АИГ, в которых было проведено ИГХ исследование, что не позволяет отнести только ее наличие к факторам риска развития НЭО по сравнению с результатами, полученными другими авторами [18], которые на примере с НЭО 1-го типа показали, что тяжелая линейная гиперплазия сама по себе, обнаруженная даже в одном биоптате, имела высокую корреляцию относительно развития неоплазии с 92% чувствительностью и 89% специфичностью.

Дополнительным важным результатом нашего исследования стало выявление тесной связи между ростом гиперпластических и диспластических ECL клеток с регенераторной зоной эпителия желез. Особенности строения слизистой оболочки тела желудка в подобных случаях заключалась в полном отсутствии париетальных клеток и зрелых главных клеток, что свидетельствовало о нарушении созревания и дифференцировки клеток, а не о разрушении зрелых клеток. С другой стороны, ECL клетки, по-видимому, не подвержены аутоиммунной агрессии, тогда как известно, что гипергастринемия вызывает избирательную гипертрофию и гиперплазию гастринзависимых ECL клеток. Таким образом, гистогенез вызванных гипергастринемией НЭО из ECL клеток при АИГ, по-видимому, тесно связан с нарушением развития эпителиальных клеток желудка в зоне обновления слизистой оболочки.

С целью исключения сопутствующего поражения НЭО желудка 1-го типа, а также выявления вновь возникших локальных поражений слизистой оболочки желудка пациентам с АИГ и выявленными признаками дисплазии ECL клеток, с нашей точки зрения, может

быть рекомендовано контрольное эндоскопическое исследование через 6 месяцев – 1 год.

В соответствии с рекомендациями ENETS от 2022 года всем пациентам с НЭО желудка 1-го типа, несмотря на отсутствие выявленных четких факторов риска, контрольное эндоскопическое исследование предлагается выполнять каждые 6–12 месяцев после постановки диагноза [19]. Этот интервал позволяет выявлять рецидивирующие поражения или возникшие вновь на ранней стадии, когда они могут быть легко удалены щадящими малоинвазивными методами с помощью гибкого эндоскопа. Данный подход представляется нам наиболее безопасным и эффективным в ситуации с НЭО желудка 1-го типа с позиций накопленного нами опыта ведения пациентов с подобной патологией.

### Заключение

По результатам проведенного нами исследования нейроэндокринные опухоли 1-го типа чаще наблюдаются у женщин в возрасте 50–60 лет и представлены в 77% случаев в виде многоочаговых полиповидных новообразований слизистой оболочки (<10 мм) в теле и/или дне желудка. Гистологически все опухоли были высокодифференцированы и имели строение от солидного до трабекулярно-губулярного. Пролиферативная активность (Ki-67, индекс MIB1) была меньше 3%. Нейроэндокринные опухоли 1-го типа характеризовались минимальной инвазивностью: 74% были ограничены слизистой оболочкой и 26% инвазировали подслизистую основу.

Таким образом, на основании результатов проведенного нами исследования у пациентов с аутоиммунным гастритом в измененной атрофичной слизистой оболочке тела желудка следует стремиться выявлять гиперпластические и в особенности диспластические изменения, свидетельствующие о повышенном риске развития нейроэндокринных опухолей, требующие адекватного эндоскопического лечения и/или наблюдения за пациентами. Мы хотим предложить рассмотреть возможность использования альтернативного термина «нейроэндокринное поражение» применительно к тем новообразованиям, размеры которых составляют более 150 мкм, но не превышают 0,5 см, с целью отказа от использования термина «дисплазия», который может привести к некорректной трактовке результатов гистологического исследования со стороны клиницистов.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.С. Тертычный, П.В. Павлов.

Сбор и обработка материала – Д.П. Нагорная, А.А. Саха, А.П. Кирюхин, А.А. Федоренко, П.В. Павлов, М.В. Мнихович, А.С. Тертычный.

Написание текста – Д.П. Нагорная, А.П. Кирюхин, М.В. Мнихович, А.С. Тертычный.

Редактирование – А.С. Тертычный, М.В. Мнихович, П.В. Павлов.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.S. Tertychnyy, P.V. Pavlov.

Collected the data and performed the analysis – D.P. Nagornaya, A.A. Sakha, A.P. Kiryukhin, A.A. Fedorenko, P.V. Pavlov, M.V. Mnikhovich, A.S. Tertychnyy.

Wrote the paper – D.P. Nagornaya, A.P. Kiryukhin, M.V. Mnikhovich, A.S. Tertychnyy.

Edited the manuscript – A.S. Tertychnyy, M.V. Mnikhovich, P.V. Pavlov.

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

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

### Литература/References

1. *Alekberzade A.B., Krylov H.H., Lipnitskiy E.M., Shakhbazov P.O., Azari F.* Нейроэндокринные опухоли желудка. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019;12:111–120. DOI: 10.17116/hirurgia2019121111.
2. *Alekberzade AV, Krylov NN, Lipnitskiy EM, Shakhbazov RO, Azari F.* Gastric neuroendocrine tumors. Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova. 2019;12:111–120 (In Russ.). DOI: 10.17116/hirurgia2019121111.
3. *Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S.* Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer.* 2015;121(4):589–97. DOI: 10.1002/cncr.29099.
4. *Xu Z, Wang L, Dai S, Chen M, Li F, Sun J et al.* Epidemiologic trends of and factors associated with overall survival for patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Netw Open.* 2021;4(9):e2124750. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.24750.
5. *Pavel M, Öberg K, Falconi M, Krenning EP, Sundin A, Perren A et al.* Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(7):844–60. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.304.
6. *Canakis A, Lee LS.* Current updates and future directions in diagnosis and management of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *World J Gastrointest Endosc.* 2022;14(5):267–90. DOI: 10.4253/wjge.v14.i5.267.
7. *Borch K, Ahrén B, Ahlman H, Falkmer S, Granérus G, Grimeilius L.* Gastric carcinoids: Biologic behavior and prognosis after differentiated treatment in relation to type. *Ann Surg.* 2005;242(1):64–73. DOI: 10.1097/01.sla.0000167862.52309.7d.
8. *Scherübl H, Cadiot G, Jensen RT, Rösch T, Stölzel U, Klöppel G.* Neuroendocrine tumors of the stomach (gastric carcinoids) are on the rise: Small tumors, small problems? *Endoscopy.* 2010;42(8):664–71. DOI: 10.1055/s-0030-1255564.
9. *Gluckman CR, Metz DC.* Gastric neuroendocrine tumors (carcinoids). *Curr Gastroenterol Rep.* 2019;21(4):13. DOI: 10.1007/s11894-019-0684-7.
10. *Klöppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P.* Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch.* 2007;451 Suppl 1:S9–27. DOI: 10.1007/s00428-007-0461-0.
11. *Solcia E, Fiocca R, Villani L, Luinetti O, Capella C.* Hyperplastic, dysplastic, and neoplastic enterochromaffin-like-cell prolifera-

- tions of the gastric mucosa. Classification and histogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1995;19 Suppl 1:S1-7. PMID: 7762735.
11. Annibale B, Azzone C, Corleto VD, di Giulio E, Caruana P, D'Ambra G et al. Atrophic body gastritis patients with enterochromaffin-like cell dysplasia are at increased risk for the development of type I gastric carcinoid. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(12):1449–56. DOI: 10.1097/00042737-200112000-00008.
  12. Vannella L, Sbrozzi-Vanni A, Lahner E, Bordini C, Pilozzi E, Corleto VD et al. Development of type I gastric carcinoid in patients with chronic atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(12):1361–9. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04659.x.
  13. Sjöblom SM, Sipponen P, Järvinen H. Gastroscopic follow up of pernicious anaemia patients. *Gut.* 1993;34(1):28–32. DOI: 10.1136/gut.34.1.28.
  14. Kokkola A, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(1):88–92. DOI: 10.1080/00365529850166266.
  15. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C et al. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):443–8. DOI: 10.1530/eje.1.01862.
  16. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E et al. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: An International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol.* 2018;31(12):1770–86. DOI: 10.1038/s41379-018-0110-y.
  17. Nagtegaal ID, Snover DC. Head to head: Should we adopt the term ‘sessile serrated lesion’? *Histopathology.* 2022;80(7):1019–25. DOI: 10.1111/his.14618.
  18. Berna MJ, Annibale B, Marignani M, Luong TV, Corleto V, Pace A et al. A prospective study of gastric carcinoids and enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 and Zollinger–Ellison syndrome: Identification of risk factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1582–91. DOI: 10.1210/jc.2007-2279.
  19. Borbath I, Pape UF, Deprez PH, Bartsch DK, Caplin M, Falconi M et al. ENETS standardized (synoptic) reporting for endoscopy in neuroendocrine tumors. *J Neuroendocrinol.* 2022;34(3):e13105. DOI: 10.1111/jne.13105.

### Информация об авторах

Александр Семенович Тертычный – доктор медицинских наук, профессор Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Максим Валерьевич Мнихович – кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Дарина Павловна Нагорная – аспирант Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Павел Владимирович Павлов – кандидат медицинских наук, заведующий отделением диагностической и лечебной эндоскопии университетской клинической больницы № 2 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Андрей Павлович Кирюхин – врач-эндоскопист отделения диагностической и лечебной эндоскопии университетской клинической больницы Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Александр Алексеевич Федоренко – врач-эндоскопист отделения диагностической и лечебной эндоскопии университетской клинической больницы № 2 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Алан Апурбович Саха – студент 5-го курса Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

### Author information

Alexander S. Tertychnyy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0001-5635-6100>

Maxim V. Mnikhovich – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher, Central Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>

Darina P. Nagornaya – Post-graduate Student, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-5907-6195>

Pavel V. Pavlov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, University Clinical Hospital No. 2, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-4391-5441>

Andrey P. Kiryukhin – Endoscopist, Department of Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, University Clinical Hospital No. 2, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0001-5685-8784>

Alexandr A. Fedorenko – Endoscopist, Department of Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, University Clinical Hospital No. 2, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-1792-5638>

Alan A. Sakha – 5<sup>th</sup>-year Student, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-9341-1479>

## Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами

А.Ю. Калининчук, Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

**Резюме.** *Введение.* Известно, что M1 и M2 макрофаги микроокружения при раке молочной железы (РМЖ) способны экспрессировать белок запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) и лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1), что может определять исход заболевания, а также ответ опухоли на лечение, в частности иммунотерапию. Тем не менее макрофагальный состав микроокружения рака молочной железы и его взаимосвязь с различными клинико-патологическими характеристиками изучены фрагментарно. Цель исследования – выявить особенности экспрессии PD-1 и PD-L1 на M1 и M2 макрофагах у пациенток с РМЖ в зависимости от менструальной функции, размера опухоли, молекулярного подтипа, лимфогенного и гематогенного метастазирования.

*Материалы и методы.* В исследование были включены 19 пациенток с диагнозом «рак молочной железы». С помощью семицветной мультиплексной TSA (tyramide signal amplification)-модифицированной иммуногистохимии идентифицированы M1 макрофаги (CD68+CD163–CD3–СКАЕ1/3–) и M2 макрофаги (CD68+/-CD163+CD3–СКАЕ1/3–), а также оценена экспрессия на них PD-1 и PD-L1.

*Результаты.* Макрофагальный состав микроокружения РМЖ variabelен по экспрессии PD-1 и PD-L1, причем она более свойственна M1 макрофагам и не зависит от молекулярного подтипа опухоли и возникновения гематогенных метастазов. При этом у пациенток с опухолями, соответствующими по размеру T2, относительное количество макрофагов с фенотипами PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 было выше, чем при T1. Различия в макрофагальном составе обнаружены у пациенток в зависимости от вовлечения в процесс лимфатических узлов. В группе пациенток без лимфогенного метастазирования в опухолях практически отсутствовали M2 макрофаги с экспрессией PD-1 в отличие от группы с метастазами в лимфатических узлах.

*Заключение.* Для рака молочной железы показано фенотипическое разнообразие макрофагов в микроокружении опухоли, а также обнаружены межперсональные различия в макрофагальном составе новообразований. Исходно разный состав макрофагов характерен для пациенток с разным размером опухоли и разной вовлеченностью в процесс лимфатических узлов.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, M1 макрофаги, M2 макрофаги, PD-L1, PD-1

**Для корреспонденции:** Анна Юрьевна Калининчук. E-mail: annakalinchuk2022@gmail.com

**Для цитирования:** Калининчук А.Ю., Таширева Л.А., Перельмутер В.М. Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами. Клини. экп. морфология. 2023;12(3):28–40. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.3.28-40.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-75-10033.

Статья поступила 15.09.2022. Получена после рецензирования 18.10.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## M1 and M2 macrophage phenotypic diversity in the tumor microenvironment in breast cancer patients: association with clinical and pathological parameters

A.Yu. Kalinchuk, L.A. Tashireva, V.M. Perelmuter

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

**Abstract.** *Introduction.* M1 and M2 macrophages in the tumor microenvironment are known to express programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1). It can determine disease outcomes and tumor response to treatment including immunotherapy. However, the macrophage composition

of the breast cancer microenvironment and its relation to various clinical and pathological features have been only partially studied. The aim of the study was to detect the PD-1 and PD-L1 expression features in M1 and M2 macrophages in breast cancer patients depending on menstruation, tumor size, molecular subtype, lymph node metastases, and hematogenous metastases.

*Materials and methods.* The study included 19 patients with breast cancer. Using seven-color multiplex TSA-modified immunohistochemistry, we identified M1 macrophages (CD68+CD163–CD3–CKAE1/3–), M2 macrophages (CD68+/-CD163+CD3–CKAE1/3–), and PD-1 and PD-L1 expression in the macrophages.

*Results.* The macrophage composition of the breast carcinoma microenvironment varies in PD-1 and PD-L1 expression. M1 macrophages are more characteristic to show their expression, and it does not depend on the molecular subtype and the presence of hematogenous metastases. Simultaneously, the relative number of macrophages with phenotypes PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M2 was higher in patients with tumor size corresponding to T2 compared to T1. Differences in macrophage composition were found in patients depending on the lymph node involvement. Patients without lymph node metastases had virtually no PD-1 expression in M2 macrophages in contrast to patients with them.

*Conclusion.* Breast cancer was shown to have phenotypic variety of macrophages in the tumor microenvironment. Moreover, macrophage composition was diverse in different individuals. Initially, a different composition of macrophages is characteristic of patients with different tumor sizes and different lymph node involvement.

**Keywords:** breast cancer, M1 macrophages, M2 macrophages, PD-L1, PD-1

**Corresponding author:** Anna Yu. Kalinchuk. E-mail: annakalinchuk2022@gmail.com

**For citation:** Kalinchuk A.Yu., Tashireva L.A., Perelmuter V.M. M1 and M2 macrophage phenotypic diversity in the tumor microenvironment in breast cancer patients: association with clinical and pathological parameters. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(3):28–40 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.28-40.

**Funding.** This study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 20-75-10033.

**Received** 15.09.2022. **Received in revised form** 18.10.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований. По данным ВОЗ, в 2020 году РМЖ был диагностирован у 2,3 миллиона женщин во всем мире [1]. Терапию и прогноз РМЖ во многом определяют свойства опухоли, например молекулярный подтип, размер и степень злокачественности [2]. Тем не менее течение заболевания, в том числе вероятность прогрессии и метастазирования, будет зависеть также от клеточного состава микроокружения опухоли, который существенно влияет на поведение опухолевых клеток [3].

Микроокружение опухоли включает различные типы клеток: лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и фибробласты [4]. Макрофаги обнаруживаются достаточно часто среди иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Макрофаги принято подразделять на две группы – классически активированные M1 и альтернативно активированные M2. M1 макрофаги секретируют провоспалительные цитокины, такие как IL-12, TNF- $\alpha$ , CXCL-10 и IFN- $\gamma$ , а также продуцируют высокие уровни NOS, в то время как M2 макрофаги секретируют противовоспалительные цитокины – IL-10, IL-13 и IL-4 и экспрессируют аргиназу-1, маннозный рецептор (CD206) и scavenger-рецептор (CD163) [5]. CD68 считается общим макрофагальным маркером, поскольку экспрессируется и M1, и M2 макрофагами [6].

M1 макрофаги способны уничтожать опухолевые клетки посредством прямой и антителозависимой кле-

точно опосредованной цитотоксичности [7]. M2 макрофаги способствуют метастазированию опухоли, ангиогенезу и ингибируют опосредованный T-клетками противоопухолевый иммунный ответ, что приводит к прогрессированию заболевания [3]. Стоит отметить, что M1 и M2 макрофаги обладают выраженной пластичностью и могут переходить из одного состояния в другое в ответ на сигналы микроокружения или терапии [8].

Преобладание в строме опухоли M2 макрофагов считается прогностическим маркером опухолевой прогрессии. Метаанализ, объединивший 16 исследований и 4541 пациента с РМЖ, показал, что обильная инфильтрация опухоли M2 макрофагами связана с отрицательным статусом рецепторов эстрогена и прогестерона, высокой степенью злокачественности и большей вероятностью сосудистой инвазии опухоли [6].

Показано, что макрофаги микроокружения опухоли экспрессируют белок запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) [9] и/или лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) [10]. Хорошо известен результат взаимодействия PD-1 T-клетки и PD-L1 опухолевой клетки. PD-1/PD-L1 представляет собой важную иммунную контрольную точку, приводящую к анергии T-клеток. Кроме того, PD-L1 может защищать опухолевые клетки от опосредованного цитотоксическими T-лимфоцитами цитолиза без передачи сигналов PD-1 в T-клетках [11]. При этом роль PD-1/PD-L1 в макрофагах имеет определенные

особенности. Например, предполагается взаимосвязь между PD-1/PD-L1 и поляризацией макрофагов, что приводит к изменению секреции цитокинов и экспрессии поверхностных маркеров в макрофагах [12]. Многие аспекты роли PD-1 и PD-L1, экспрессирующихся на макрофагах, также требуют уточнения для лучшего понимания механизмов действия и причин неэффективности иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

Таким образом, целью данного исследования стало изучение особенностей макрофагального состава микроокружения опухоли и определение его взаимосвязи с клинико-патологическими характеристиками пациенток с раком молочной железы.

### Материалы и методы

В исследование были включены 19 пациенток с гистологически верифицированным диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа» (T1–3N0–1M0, возраст от 43 до 78 лет), проходивших лечение на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ. Пациентки получали терапию в соответствии с клиническими рекомендациями.

Клинико-патологические характеристики пациенток представлены в таблице 1.

В работе использованы данные мультиплексной TSA (tyramide signal amplification)-модифицированной иммуногистохимии (ИГХ) срезов тканей (рис. 1). Срезы были получены из фиксированной формалином и залитой парафином ткани первичной опухоли молочной железы. Депарафинизацию, демаскировку и окрашивание ткани проводили автоматически с применением иммунопейнера BOND RXm (Leica Biosystems, Германия). TSA-модифицированная ИГХ в отличие от обычной дает возможность исследовать в ткани одновременно экспрессию нескольких белков. Для исследования была составлена панель маркеров: PD-1, CD68, PD-L1, CD3, CD163 и СКАЕ1/3. Окрашивание каждого среза включало шесть циклов. Каждый цикл состоял из следующих этапов: присоединение первичного антитела к эпитопу ткани, добавление вторичных антител с HRP (horseradish peroxidase) и флуоресцентной метки с тирамидом, активация тирамидов, конъюгация метки с тирозиновыми остатками вблизи эпитопа и удаление комплекса антител. Для окрашивания использовали набор Opal 7-color Automation IHC Kit (Akoya Bioscience, США).

Таблица 1 | Table 1

### Клинико-патологические характеристики пациенток | Clinical and pathological characteristics of the patients

Параметры   Parameters		Частота, n (%)   Frequency, n (%)
Возраст, лет   Age, years	<50	5/19 (26,3%)
	>50	14/19 (73,7%)
Менструальная функция   Menstruation	менопауза   menopause	14/19 (73,7%)
	сохранена   yes	5/19 (26,3%)
Неoadъювантная химиотерапия   Neoadjuvant chemotherapy	нет   no	17/19 (89,5%)
	нет данных   no data	2/19 (10,5%)
Молекулярный подтип   Molecular subtype	люминальный А   luminal A	6/19 (31,6%)
	люминальный В (HER2-)   luminal B (HER2-)	9/19 (47,4%)
	трижды негативный   triple-negative	4/19 (21,0%)
Категория Т (размер первичной опухоли)   T category (primary tumor size)	1	8/19 (42,1%)
	2	9/19 (47,3%)
	3	1/19 (5,3%)
	нет данных   no data	1/19 (5,3%)
Лимфогенные метастазы   Lymph node metastases	нет   no	12/19 (63,1%)
	есть   yes	6/19 (31,6%)
	нет данных   no data	1/19 (5,3%)
Гематогенные метастазы   Hematogenous metastases	нет   no	14/19 (73,7%)
	есть   yes	4/19 (21,0%)
	нет данных   no data	1/19 (5,3%)

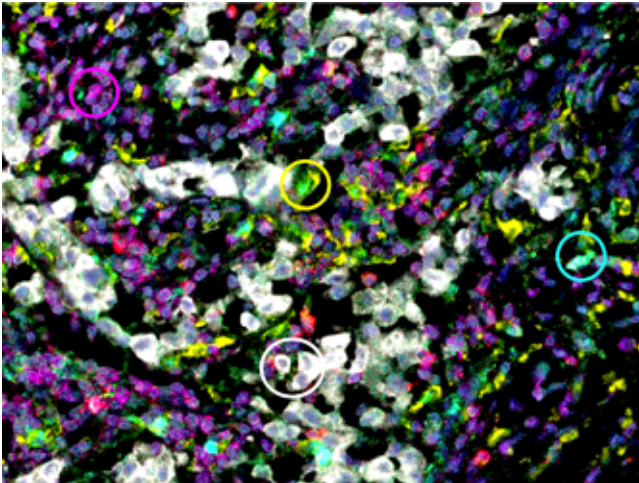


Рис. 1. M1 и M2 макрофаги, а также экспрессия ими PD-L1 и PD-1 в микроокружении опухоли молочной железы. TSA-модифицированная ИГХ,  $\times 400$ . PD-1 – красный, CD68 – голубой, PD-L1 – зеленый, CD3 – пурпурный, CD163 – желтый, СК AE1/AE3 – белый, DAPI – синий. Пурпурный круг – CD3+ лимфоциты, желтый круг – PD1-PDL1+ M2 макрофаг, белый круг – опухолевые клетки, голубой круг – PD1-PDL1- M1 макрофаг

Fig. 1. M1 and M2 macrophages expressing PD-L1 and PD-1 in the tumor microenvironment in breast carcinoma. TSA-modified IHC,  $\times 400$ . PD-1 – red, CD68 – cyan, PD-L1 – green, CD3 – purple, CD163 – yellow, СК AE1/AE3 – white, DAPI – blue. Purple circle: CD3+ lymphocytes, yellow circle: PD1-PDL1+ M2 macrophage, white circle: tumor cells, cyan circle: PD1-PDL1- M1 macrophage

Первичные антитела включали anti-PD-1 (Cell Marque, США, клон NAT105, 1:100), anti-CD68 (Agilent Dako, США, клон KP1, 1:5), anti-PD-L1 (Ventana, США, клон SP142, 1:50), anti-CD3 (Agilent Dako, США, поликлональные, 1:5), anti-CD163 (Diagnostic Biosystems, США, клон 10D6, 1:100), anti-CKAE1/3 (Agilent Dako, США, клон AE1/AE3, 1:20). Визуализация в ткани PD-1 осуществлялась с помощью Opal520 (1:150), CD68 – Opal540 (1:150), PD-L1 – Opal570 (1:150), CD3 – Opal620 (1:150), CD163 – Opal650 (1:150), CKAE1/3 – Opal690 (1:150). Для окрашивания ядер применяли ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Окрашенные срезы сканировали и анализировали репрезентативные области, содержащие участки опухоли и стромы, с использованием системы мультиплексного анализа ткани Vectra 3.0.3 (PerkinElmer, США). Анализ полученных изображений проводили с использованием программы inForm 2.4.2. Для каждого комплекса маркер-Opal были созданы спектральные библиотеки, затем проведено исключение аутофлуоресценции изображений с помощью неокрашенной контрольной ткани опухоли молочной железы. Фенотип M1 макрофагов определялся как CD68+CD163-CD3-CKAE1/3-, M2 макрофагов – как CD68+/-CD163+CD3-CKAE1/3-, лимфоцитов – как CD68-CD163-CD3+CKAE1/3-, опухолевых

клеток – как CD68-CD163-CD3-CKAE1/3+. На макрофагах была оценена экспрессия PD-1 и PD-L1 и выделено восемь фенотипов: PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1, PD1+PDL1+ M1, PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2, PD1+PDL1+ M2.

В 4–5 полях зрения подсчитывали абсолютное количество макрофагов каждого из изучаемых фенотипов, а также лимфоцитов, располагающихся в строме и среди опухолевых клеток. Относительные количества макрофагов и лимфоцитов подсчитаны как проценты от суммы всех клеток стромы. Относительные количества M1 и M2 макрофагов приведены в виде процентов от суммы всех макрофагов стромы. Для оценки макрофагальной формулы микроокружения каждый из фенотипов макрофагов был представлен как процент от суммы M1 или M2 макрофагов.

Статистическая обработка проведена в программах Statistica 12 (StatSoft, США) и Prism 8.0.1. (GraphPad, США). Все количественные данные были представлены в виде Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>), поскольку не подчинялись нормальному закону распределения. Для сравнения двух или трех независимых групп применялись непараметрические критерии Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса, соответственно. При сравнении двух зависимых групп использовался непараметрический критерий Уилкоксона. Сравнение двух или трех групп по качественному признаку было проведено с помощью критерия хи-квадрат. Результаты представлены в виде n/N (%). При проведении корреляционного анализа применен непараметрический критерий Спирмена. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Исследование одобрено комиссией по биоэтике НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (протокол № 7 от 25.08.2020). Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

## Результаты

Как M1, так и M2 макрофаги были обнаружены в карциномах 100% включенных в исследование пациенток (19/19). Относительное количество макрофагов в микроокружении опухоли от общего количества неопухолевых элементов составило 12,1% (8,5; 15,7). Более половины макрофагов имело фенотип M2 – 66,6% (63,4; 86,5), а доля M1 составила 33,4% (13,5; 36,6) ( $p < 0,0001$ ).

PD1-PDL1- M1 и M2 макрофаги присутствовали в микроокружении опухоли у 100% пациенток. PD1+PDL1- M1 макрофаги обнаруживались чаще, чем PD1+PDL1- M2 макрофаги. PD1-PDL1+ M1 и M2, а также PD1+PDL1+ M1 и M2 фенотипы присутствовали у большинства пациенток, причем их частота встречаемости не различалась (табл. 2).

Большинство M2 макрофагов микроокружения при РМЖ не имеет экспрессии PD-1 и PD-L1 в отличие от M1. Согласно составленной макрофагальной

Таблица 2 | Table 2

Макрофагальная формула микроокружения при РМЖ [N=19, частоты встречаемости представлены в n/N (%)] |  
 Macrophage formula of the microenvironment in breast cancer [N=19, frequencies, n/N (%)]

	PD1-PDL1-	PD1+PDL1-	PD1-PDL1+	PD1+PDL1+
M1	19/19 (100%)	16/19 (84,2%)	17/19 (89,5%)	15/19 (78,9%)
M2	19/19 (100%)	5/19 (26,3%)	19/19 (100%)	10/19 (52,6%)
p	1,000	0,001	0,487	0,170

Таблица 3 | Table 3

Макрофагальная формула микроокружения при РМЖ (N=19, доли представлены в % от M1, % от M2) |  
 Macrophage formula of the microenvironment in breast cancer (N=19, proportions, % of M1, % of M2)

	PD1-PDL1-	PD1+PDL1-	PD1-PDL1+	PD1+PDL1+
M1	51,9 (36,6; 66,4)	4,8 (1,4; 18,2)	27,0 (15,8; 40,6)	5,4 (1,4; 14,6)
M2	80,2 (72,8; 86,8)	0,0 (0,0; 0,2)	18,6 (12,9; 27,2)	0,4 (0,0; 0,5)
p	<0,0001	<0,0001	0,049	<0,0001

формуле, для M1 макрофагов более характерна экспрессия PD-1 или/и PD-L1 (табл. 3).

Анализ связи между относительными количествами M1 макрофагов и M2 макрофагов с учетом экспрессии ими PD-1 или/и PD-L1 показал прямую связь количества PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1- M2 ( $r=0,79$ ;  $p=0,000$ ), PD1-PDL1+ M1 и PD1-PDL1+ M2 ( $r=0,57$ ;  $p=0,011$ ), а также PD1+PDL1+ M1 и PD1-PDL1+ M2 ( $r=0,64$ ;  $p=0,003$ ). Обратная связь была показана для количества PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1+ M2 ( $r=-0,75$ ;  $p=0,000$ ), PD1-PDL1- M1 и PD1+PDL1+ M2 ( $r=-0,50$ ;  $p=0,030$ ), PD1-PDL1+ M1 и PD1-PDL1- M2 ( $r=-0,50$ ;  $p=0,029$ ), PD1+PDL1+ M1 и PD1-PDL1- M2 ( $r=-0,68$ ;  $p=0,001$ ) (рис. 2). Сильная взаимосвязь наблюдалась между двумя парами фенотипов: PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1- M2, PD1-PDL1- M1 и PD1-PDL1+ M2.

имосвязь имели только те фенотипы M1 и M2 макрофагов, которые экспрессировали PD-L1 независимо от экспрессии PD-1. Исключение составляла положительная связь между M1 и M2 макрофагами, не экспрессирующими ни PD-1, ни PD-L1. Перекрестная отрицательная связь наблюдалась между не экспрессирующими PD-1 и PD-L1 M1 и экспрессирующими PD-L1 M2, а также между не экспрессирующими PD-1 и PD-L1 M2 и экспрессирующими PD-L1 M1. Отрицательная связь также не зависела от экспрессии PD-1.

Были оценены частота встречаемости (рис. 3) и доля макрофагов с различным сочетанием экспрессии PD-1 и PD-L1 в зависимости от разных клинико-патологических параметров.

У пациенток с размером опухоли до 2 см (T1) PD1+PDL1- M2 макрофаги не обнаруживались, однако

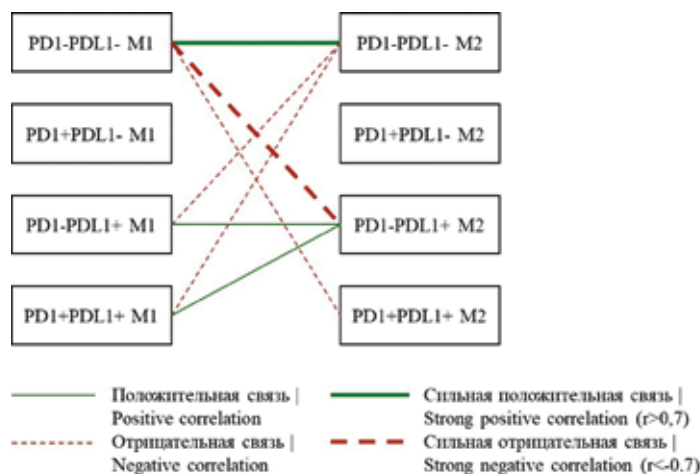


Рис. 2. Взаимосвязи между относительными количествами M1 и M2 макрофагов различных фенотипов

Fig. 2. Association between the number of M1 and M2 macrophages of different phenotypes



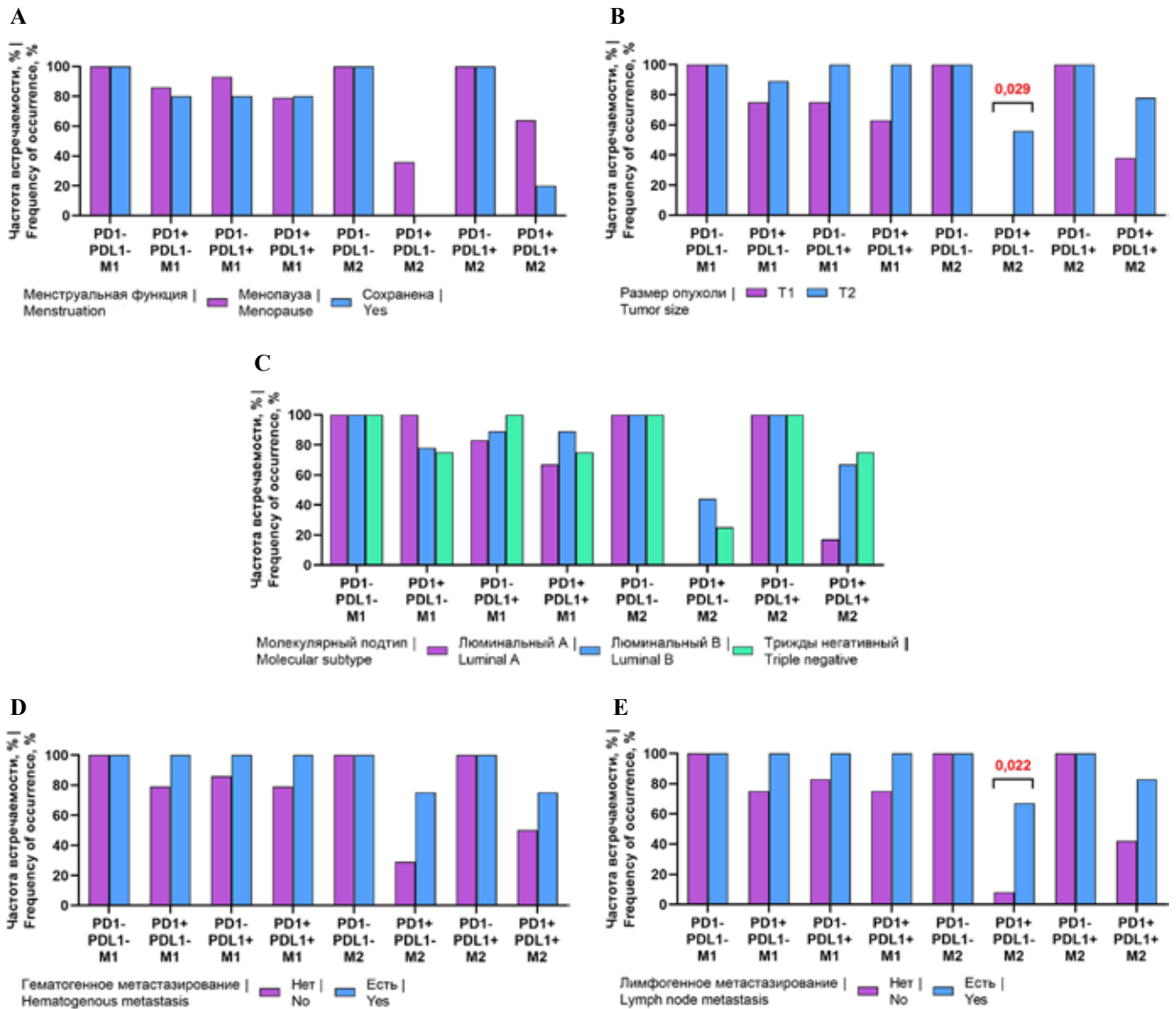


Рис. 3. Частота встречаемости макрофагов в опухоли в зависимости от менструальной функции (А), размера новообразования (В), молекулярного подтипа (С), наличия лимфогенных метастазов (D), наличия гематогенных метастазов (Е)

Fig. 3. Frequency of occurrence of macrophages in the tumor depending on: menstruation (A), tumor size (B), molecular subtype (C), lymph node metastases (D), hematogenous metastases (E)

они присутствовали у 55,6% пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см (T2) ( $p=0,029$ ). Этот же фенотип макрофагов встречался чаще у пациенток с метастазами в лимфатические узлы (66,7%) по сравнению с пациентками без лимфогенных метастазов (8,3%) ( $p=0,022$ ). Частота встречаемости остальных фенотипов не была ассоциирована ни с одним из рассмотренных клинико-патологических параметров (рис. 3).

Состояние менструальной функции не было связано с количеством макрофагов в целом и каждого из их типов (рис. 4).

У пациенток с опухолями, соответствующими по размеру значению параметра T2, относительное количество макрофагов с фенотипом PD1-PDL1+ M1 было выше, чем при T1 (38,8% (23,0; 43,4) и 16,8% (7,9; 31,3), соответ-

ственно,  $p=0,046$ ). Также наблюдалось различие в долях макрофагов типа PD1+PDL1+ M2 – 0,0% (0,0; 0,4) и 0,5% (0,4; 0,9) при T1 и T2, соответственно ( $p=0,046$ ) (рис. 5).

Доли макрофагов среди клеток стромы были наименьшими при люминальном В подтипе ( $p=0,026$ ,  $p=0,034$ ) и не различались ( $p=0,914$ ) при люминальном А и трижды негативном (8,5% (7,4; 8,8), 14,7% (12,1; 24,4) и 14,2% (11,3; 19,8), соответственно). Относительное количество M1 и M2 макрофагов не различалось в разных молекулярных подтипах опухолей. Аналогично доли макрофагов, экспрессирующих PD-1 и/или PD-L1, не имели различий в зависимости от молекулярного подтипа опухоли (рис. 6).

У пациенток с метастазами в лимфатических узлах M2 макрофагов с экспрессией PD-1 было больше,

чем у пациенток без лимфогенного метастазирования. В частности, относительное количество PD1+PDL1– M2 макрофагов в данных группах пациенток составляло 0,3% (0,0; 0,9) и 0,0% (0,0; 0,0), соответственно ( $p=0,032$ ), а количество PD1+PDL1+ M2 макрофа-

гов – 0,7% (0,5; 1,1) и 0,0% (0,0; 0,4), соответственно ( $p=0,014$ ) (рис. 7).

Гематогенное метастазирование также было связано с различиями в количестве макрофагов микроокружения опухоли (рис. 8) У пациенток с возникшими

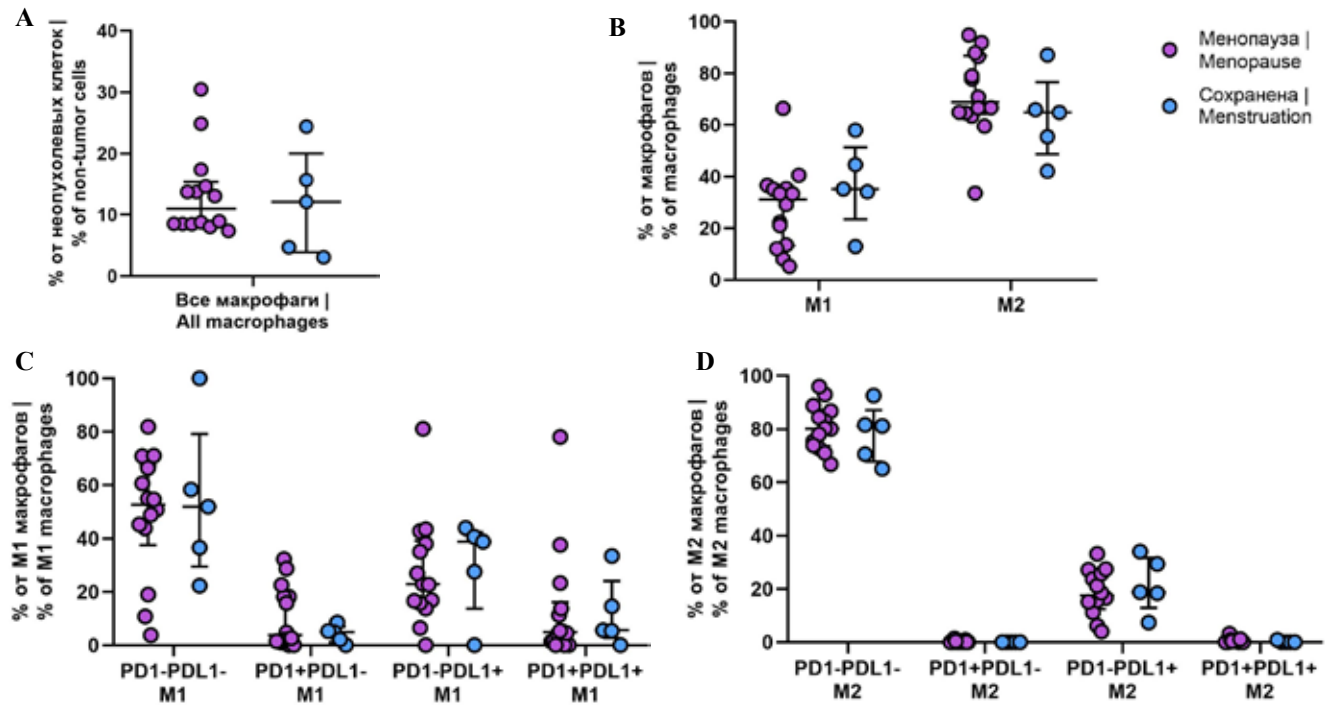


Рис. 4. Доля макрофагов в зависимости от менструальной функции.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 4. Proportion of macrophages depending on menstruation.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

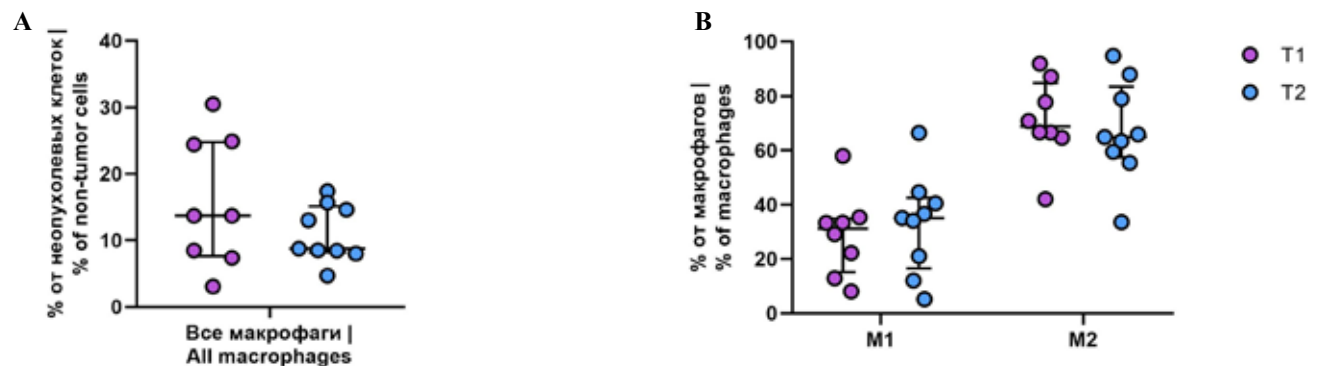


Рис. 5. Доля макрофагов в зависимости от размера опухоли (значения параметра Т).

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли

Fig. 5. Proportion of macrophages depending on tumor size (value of the parameter T).

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor

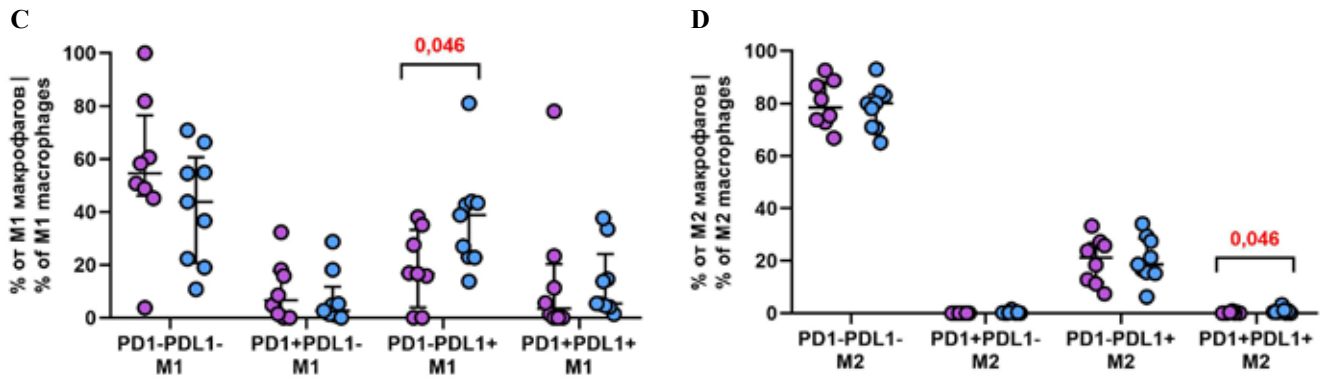


Рис. 5 (окончание). Доля макрофагов в зависимости от размера опухоли (значения параметра T).

С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 5 (end). Proportion of macrophages depending on tumor size (value of the parameter T).

С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

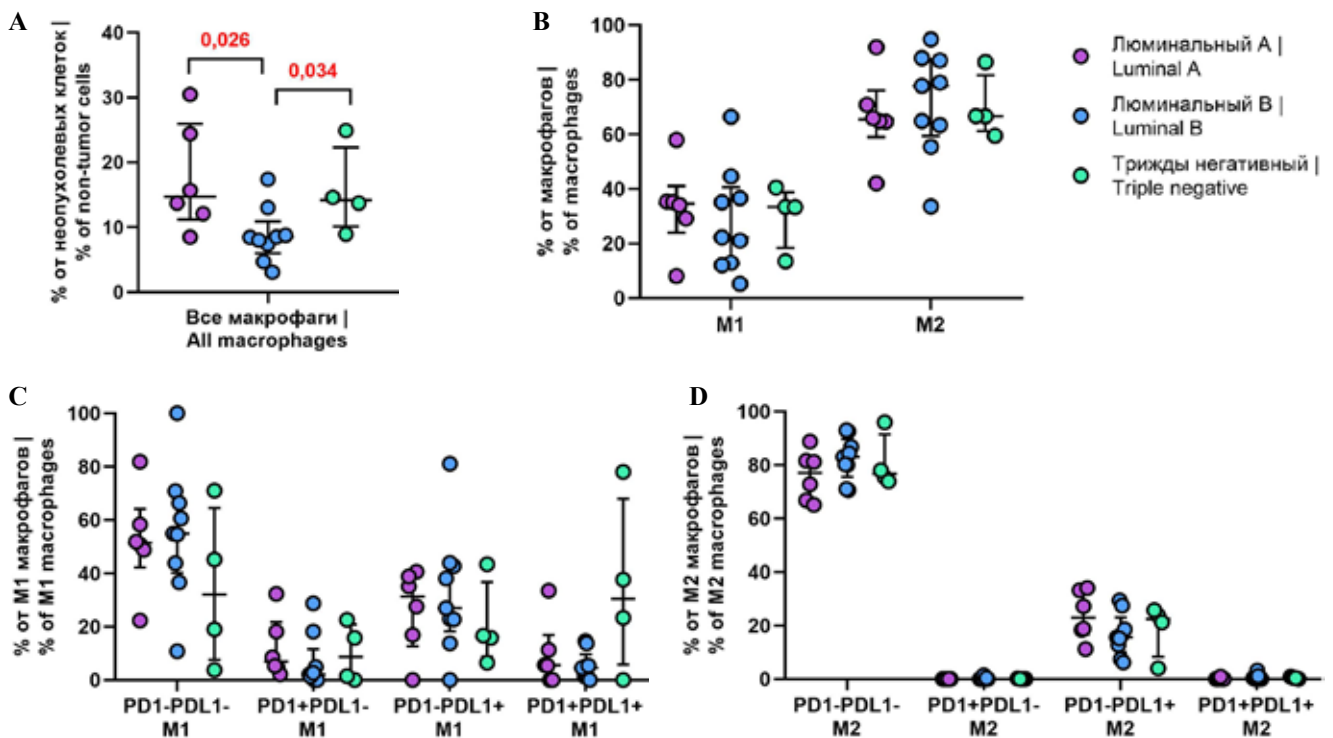


Рис. 6. Доля макрофагов в зависимости от молекулярного подтипа опухоли.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 6. Proportion of macrophages depending on tumor molecular subtype.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

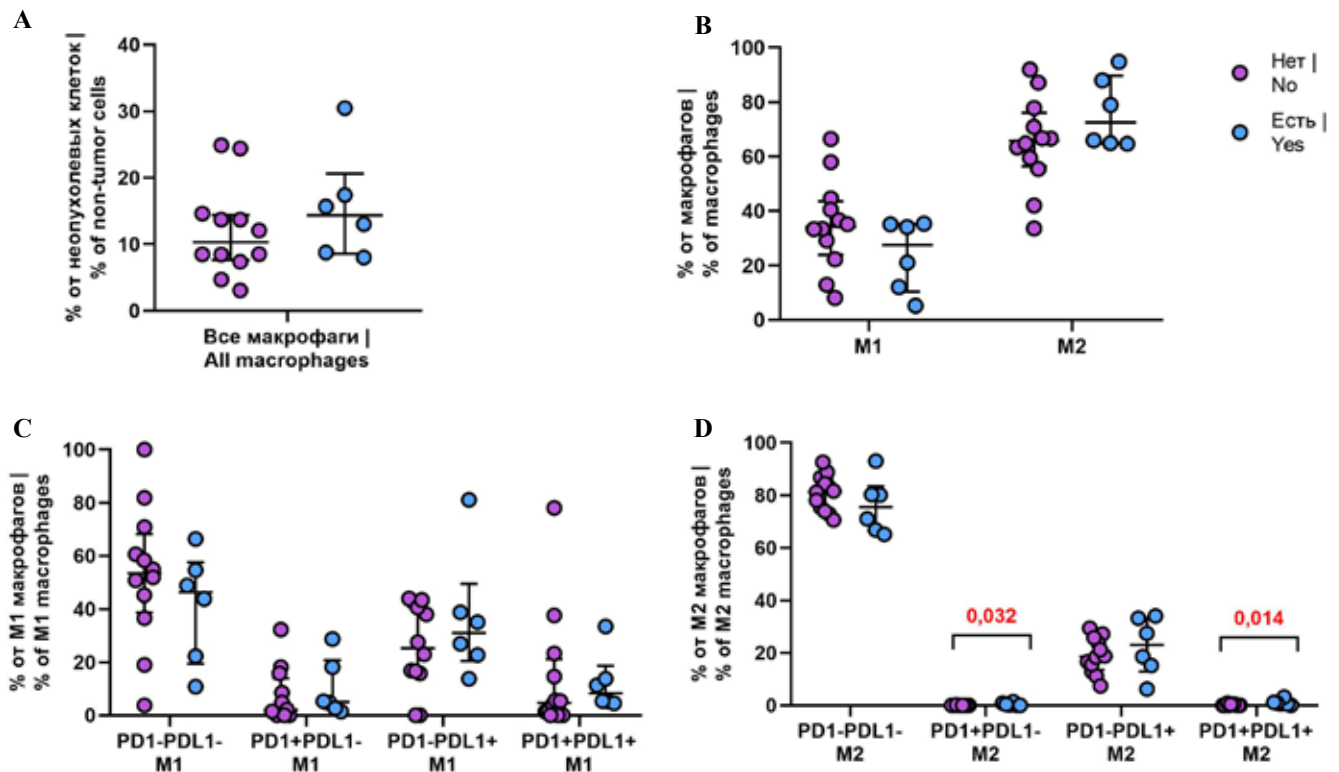


Рис. 7. Доля макрофагов в зависимости от наличия лимфогенных метастазов.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли, С – процентное распределение PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 7. Proportion of macrophages depending on the presence of lymph node metastases.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor, С – percentage distribution of PD1–PDL1– M1, PD1+PDL1– M1, PD1–PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1–PDL1– M2, PD1+PDL1– M2, PD1–PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

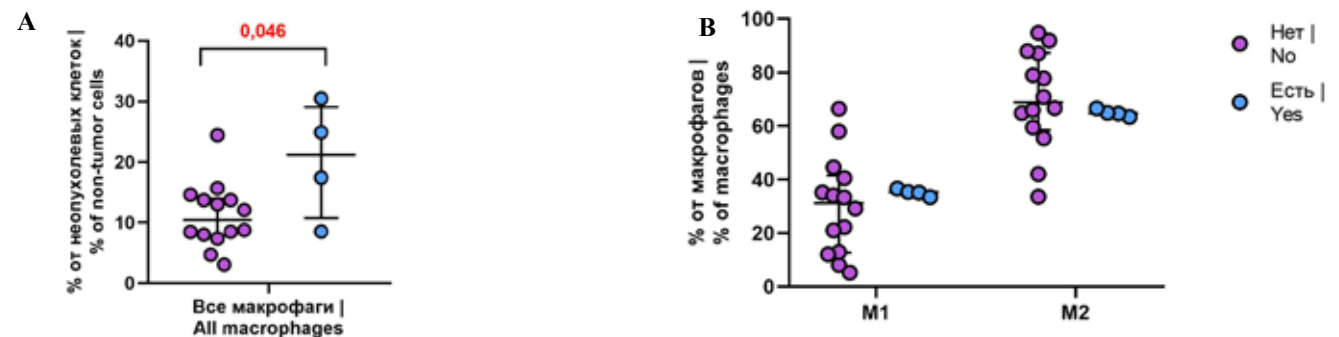


Рис. 8. Доля макрофагов в зависимости от наличия гематогенных метастазов.

А – процентное распределение макрофагов по отношению ко всем неопухолевым клеткам, В – процентное распределение M1 и M2 макрофагов по отношению ко всем макрофагам в опухоли

Fig. 8. Proportion of macrophages depending on the presence of hematogenous metastases.

А – percentage distribution of macrophages to all non-tumor cells, В – percentage distribution of M1 and M2 macrophages to all macrophages in the tumor

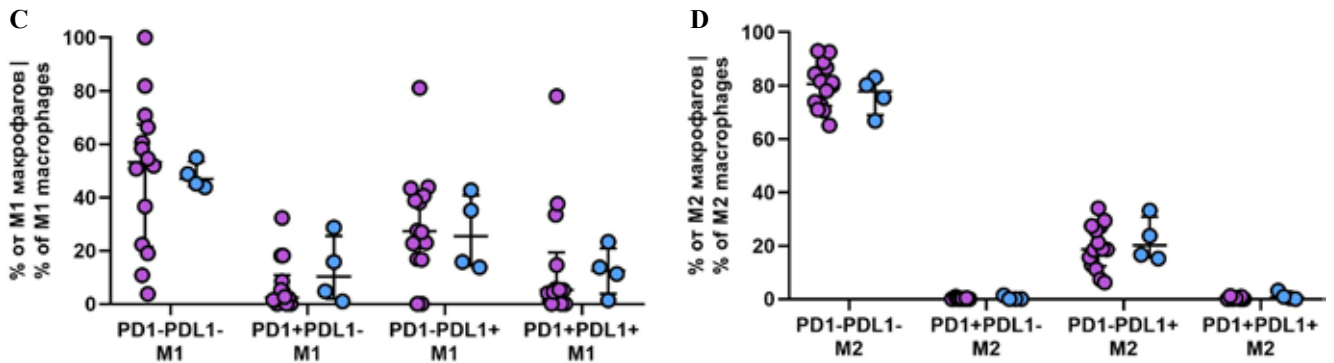


Рис. 8 (окончание). Доля макрофагов в зависимости от наличия гематогенных метастазов.

С – процентное распределение PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M1 макрофагов по отношению ко всем M1 макрофагам в опухоли, D – процентное распределение PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофагов по отношению ко всем M2 макрофагам в опухоли

Fig. 8 (end). Proportion of macrophages depending on the presence of hematogenous metastases.

C – percentage distribution of PD1-PDL1- M1, PD1+PDL1- M1, PD1-PDL1+ M1 and PD1+PDL1+ M1 macrophages to all M1 macrophages in the tumor, D – percentage distribution of PD1-PDL1- M2, PD1+PDL1- M2, PD1-PDL1+ M2 and PD1+PDL1+ M2 macrophages to all M2 macrophages in the tumor

впоследствии отдаленными метастазами процент макрофагов микроокружения от общего числа неопухолевых клеток составил 21,1% (13,0; 27,7), что выше, чем у пациенток без метастазов, – 10,4% (8,0; 13,7) ( $p=0,046$ ).

Тем не менее подобная связь терялась, когда учитывались подтип макрофагов и экспрессия ими PD-1 или/и PD-L1 (рис. 8).

## Обсуждение

Показанием к иммунотерапии трижды негативно-го РМЖ ингибиторами иммунных контрольных точек служит наличие в строме опухоли более 1% клеток, экспрессирующих PD-L1 [13]. Механизм полезного эффекта иммунотерапии в таких случаях до конца не понятен. Судя по показателю, определяющему вероятность положительного эффекта иммунотерапии, он может быть обусловлен изменением функционального состояния иммунцитов, которое происходит при взаимодействии антител с PD-L1 на клетках, формирующих иммуновоспалительное микроокружение в опухоли [14]. В связи с этим особое значение имеет понимание характера зависимости активности лимфоцитов, макрофагов и других иммунцитов от экспрессии на них PD-L1 или PD-1. Прежде всего это касается способности секретировать цитокины и проявлять пластические свойства, трансформируясь в разные функциональные типы клеток.

Макрофаги являются одними из ключевых клеток иммунных реакций в микроокружении как РМЖ, так и опухолей других локализаций, например рака почки, колоректального рака, рака предстательной железы [15], рака яичника [16]. По этой причине столь важно понимание механизмов активации и ингибирования макрофагов. Влияние экспрессии PD-1 и PD-L1 на макрофагах на течение про- и противоопухолевых иммунных реакций микроокружения изучено неполностью. Считается, что связывание PD-L1, экспрессируемого

на макрофагах, с PD-1 на Т-клетках противодействует костимулирующему и антигенпрезентирующему эффекту макрофагов на Т-клетки, что приводит к анергии Т-клеток и ускользанию опухолевых клеток от иммунного ответа [17]. Тем не менее имеются данные о том, что в отличие от PD-L1, экспрессируемого на опухолевых клетках, который подавляет активность CD4+ лимфоцитов, PD-L1+ макрофаги не вызывают такого эффекта. При взаимодействии PD-L1+ макрофагов с PD-1+ Т-лимфоцитами не происходит разрушения макрофагов [18].

Предположительно индукторами экспрессии PD-1 у макрофагов являются цитокины Т-клеток, в частности IFN- $\gamma$ , а также DAMP, связывающиеся с TLR макрофагов [12]. Экспрессия PD-L1 увеличивается в M1 макрофагах при индуцировании с помощью CSF2, LPS или IFN- $\gamma$  [17], в то время как IL-4, IL-6, IL-10 и IL-13 могут повышать экспрессию CD163, CD204 и PD-L1 на незрелых макрофагах [19].

PD-L1-сигнальный путь регулирует активность и пролиферативную способность макрофагов. S. Singhal et al. показали, что взаимодействие PD-L1 макрофага и PD-1 Т-клетки защищает макрофаг от разрушения Т-клеткой [18]. Обработка антителами против PD-L1 приводила к увеличению пролиферативной активности и выживаемости PD-L1+ макрофагов, а также повышению экспрессии костимулирующих молекул и цитокинов [17, 20]. Антитела против PD-L1 оказывали на макрофаги действие, сходное с эффектами растворимой молекулы CD80 (sCD80) или растворимого PD-1 (sPD-1). CD80 является альтернативным лигандом для PD-L1, причем CD80 оказывал более сильное влияние на макрофаги, чем PD-1 [20].

Экспрессия PD-L1 или PD-1 препятствует противоопухолевому действию макрофагов, функция которых может восстанавливаться после блокады PD-L1/PD-1. Макрофаги с высокой экспрессией PD-L1 или PD-1 рас-

считают как функционально истощенные [17]. Согласно полученной в проведенном нами исследовании макрофагальной формуле микроокружения РМЖ, доля макрофагов, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, выше среди M1 макрофагов по сравнению с M2 макрофагами. Учитывая это, следует считать, что M2 макрофаги более склонны к осуществлению различных молекулярных взаимодействий с опухолевыми клетками, чем M1 макрофаги. Существуют исследования, в ходе которых были получены сходные данные, однако на уровне экспрессии генов. Так, результаты сравнения транскрипционных различий макрофагов M1 (индуцированных CSF2 или LPS/IFN- $\gamma$ ) и M2 (индуцированных CSF1 или IL-4), по данным Gene Expression Omnibus (GSE95404, 71253, 66805, 95405, 69607), показали, что экспрессия PD-L1 значительно выше в M1 макрофагах, чем в M2 макрофагах [17]. J.P. Antonios et al. показали, что экспрессия PD-L1 также значительно выше в клетках CD163-, чем в клетках CD163+ [21].

Вместе с тем имеются результаты, демонстрирующие, что подавление экспрессии PD-L1 в макрофагах приводило к снижению экспрессии IL-10 и аргиназы-1 и увеличению экспрессии IL-12 и TNF- $\alpha$  у M2 макрофагов [22, 23]. С одной стороны, этот результат свидетельствует о том, что активная экспрессия PD-L1 на макрофагах сочетается с их M2 поляризацией и не препятствует высокому уровню экспрессии IL-10, а с другой – подавление экспрессии PD-L1 вызывает трансформацию M2 макрофагов в M1. Однако прямое влияние PD-L1 на поляризацию макрофагов неясно.

Проведенный анализ ассоциаций позволяет обсуждать характер функциональных взаимоотношений между M1 и M2 макрофагами. Положительная связь между M1 и M2, не экспрессирующими PD-1 и PD-L1, а также экспрессирующих PD-L1 может свидетельствовать о возможности одновременного, но это не значит что одинакового по количеству накопления в микроокружении опухоли антагонистических по функции макрофагов. Резльтирующий антагонизм M1 и M2 макрофагов подчеркивается отрицательными связями. В соответствии с этими ассоциациями увеличение в микроокружении PD-L1+ M2 должно сочетаться с уменьшением количества M1, а увеличение PD-L1+ M1 – с уменьшением числа M2 макрофагов. Эти эффекты достигаются, по-видимому, благодаря тому, что экспрессия PD-L1 не препятствует секреции макрофагами специфических для каждого типа цитокинов.

PD1+PDL1- M1 макрофаги микроокружения РМЖ обнаруживаются у большинства пациенток, а PD1+PDL1- M2 только у четверти, согласно полученным нами данным. Экспрессия PD-1 в макрофагах играет супрессорную роль, ингибируя фагоцитоз и противоопухолевую активность, и может быть связана с поляризацией в M2 фенотип. Эти эффекты могут быть подавлены антителами против PD-1/PD-L1 [9]. Кроме того, PD-1 может также влиять на секрецию цитокинов макрофагами. По данным С.Д. Ма

et al., экспрессия PD-1 отрицательно коррелировала с экспрессией IL-12 в моноцитах крови [24], а активация PD-1 рекомбинантным PD-L1 снижала выработку IL-6 макрофагами [25]. Анти-PD-1 терапия индуцирует в макрофагах поляризацию M1 и оказывает противоопухолевый эффект в отсутствие CD8+ Т-клеток [26].

Нами рассмотрена связь количества макрофагов, учитывая экспрессию PD-1 и/или PD-L1, и параметров, характеризующих течение РМЖ. Показано, что макрофагальный состав микроокружения не различался в зависимости от молекулярного подтипа. При этом наименьшее общее количество макрофагов все же было характерно для люминального В подтипа. Для пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см и метастатическим поражением лимфатических узлов было характерно повышение количества макрофагов с экспрессией PD-1 и/или PD-L1 в строме опухоли. У пациенток с размером опухоли от 2 до 5 см относительное количество PD1 PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 выше, чем у пациенток с размером опухоли до 2 см. Известно, что высокая экспрессия Ki67 связана с более агрессивным ростом опухоли, более выраженной степенью инфильтрации опухолевого микроокружения макрофагами и более высоким риском развития рецидива заболевания [27]. При этом сообщалось, что экспрессия PD-L1 или PD-1 тормозит противоопухолевое действие макрофагов [17]. Все это согласуется с полученными нами данными.

При лимфогенном метастазировании в строме опухоли появляются PD1+PDL1- M2 и PD1+PDL1+ M2 макрофаги, в то время как у пациенток без лимфогенных метастазов эти клетки в строме практически отсутствуют. На основании этих данных можно предположить, что лимфогенное метастазирование ассоциировано с PD-1+ M2 макрофагами, у которых, вероятно, ингибирована секреция цитокинов. Для M2 макрофагов характерна секреция TGF $\beta$ 1 [28], который способен переключать подвижность опухолевых клеток с коллективной на индивидуальную посредством программы транскрипции, включающей *Smad4*, *EGFR*, *Nedd9*, *M-RIP*, *FARP* и *RhoC*. Блокада передачи сигналов TGF $\beta$  предотвращает индивидуальную миграцию клеток *in vivo*, но не подавляет коллективную миграцию. Клетки, ограниченные коллективной миграцией, способны к лимфатической инвазии, но не к гематогенному распространению [29]. По нашим данным, PD-1+ M2 макрофаги ассоциированы с лимфогенным метастазированием, а для гематогенного метастазирования имеет значение не столько тип макрофагов, сколько их общее количество. Это подчеркивает различный вклад микроокружения в эти два вида опухолевой прогрессии. Практическая значимость проведенного исследования заключается в обнаружении фенотипов макрофагов, которые ассоциированы с неблагоприятным течением заболевания и могут в дальнейшем использоваться в качестве прогностических маркеров.

## Заключение

M1 и M2 макрофаги обладают выраженной гетерогенностью по экспрессии PD-1 и PD-L1. M2 представлены в опухоли в большем количестве. При этом доля M2, несущих рецептор и лиганд программированной клеточной гибели, меньше, что говорит о том, что вероятность их блокирования меньше, а значит, больше вероятность функционально активного состояния. Только два фенотипа макрофагов – PD1–PDL1+ M1 и PD1+PDL1+ M2 – в нашем исследовании были ассоциированы с увеличением размера опухоли, и также два фенотипа – PD1+PDL1– M2 и PD1+PDL1+ M2 – были связаны с лимфогенным метастазированием. Если в качестве предсказательного фактора эффективности ингибиторов иммунных контрольных точек оцениваются функциональные характеристики макрофагов, следует оценивать долю M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1, увеличение которой является неблагоприятным фактором относительно лимфогенного метастазирования. Также необходимо иметь в виду, что экспрессия PD-L1 на M1 является фактором, подавляющим их активность, что в нашем исследовании ассоциировано с большей величиной первичной опухоли. Можно ожидать, учитывая полученные результаты, что применение ингибиторов иммунных контрольных точек при описанном исходном состоянии макрофагально-го звена может привести к активации макрофагов M1 типа. Относительно M2 макрофагов этот эффект будет менее заметен, что может служить ожиданию хорошего общего эффекта. Тем не менее следует иметь в виду, что на функции M2 макрофагов, экспрессирующих PD-1, количество которых связано с лимфогенным метастазированием, подобная терапия влиять не будет.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.А. Таширева, А.Ю. Калинчук.  
Сбор и обработка материала – А.Ю. Калинчук, Л.А. Таширева.  
Написание текста – А.Ю. Калинчук, В.М. Перельмутер.  
Редактирование – В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.A. Tashireva, A.Yu. Kalinchuk.  
Collected the data and performed the analysis – A.Yu. Kalinchuk, L.A. Tashireva.  
Wrote the paper – A.Yu. Kalinchuk, V.M. Perelmuter.  
Edited the manuscript – V.M. Perelmuter, L.A. Tashireva.

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

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

## Литература/References

- World Health Organization. Fact sheets. Breast cancer. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (accessed 05.09.2022).
- Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412–24. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.412.
- Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol*. 2020;11:583084. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583084.
- Li JJ, Tsang JY, Tse GM. Tumor microenvironment in breast cancer – Updates on therapeutic implications and pathologic assessment. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4233. DOI: 10.3390/cancers13164233.
- Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):76. DOI: 10.1186/s13045-019-0760-3.
- Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: A meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2017;8(18):30576–86. DOI: 10.18632/oncotarget.15736.
- Ковалева О.В., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Цитотоксическая активность макрофагов и ее роль в патогенезе опухолей. Альманах клинической медицины. 2022;50(1):13–20. DOI: 10.18786/2072-0505-2022-50-008.  
Kovaleva OV, Podlesnaya PA, Grachev AN. Macrophage cytotoxic activity and its role in the tumor pathogenesis. *Almanac of Clinical Medicine*. 2022;50(1):13–20 (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2022-50-008.
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123–47. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495–9. DOI: 10.1038/nature22396.
- Wagner J, Rapsomaniki MA, Chevrier S, Anzeneder T, Langwieder C, Dykgers A et al. A single-cell atlas of the tumor and immune ecosystem of human breast cancer. *Cell*. 2019;177(5):1330–45.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.005.
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*. 2018;48(3):434–52. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- Lu D, Ni Z, Liu X, Feng S, Dong X, Shi X et al. Beyond T-cells: understanding the role of PD-1/PD-L1 in tumor-associated macrophages. *J Immunol Res*. 2019;2019:1919082. DOI: 10.1155/2019/1919082.
- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf16/p160002c.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/p160002c.pdf) (accessed 05.09.2022)
- Асатурова А.В., Трегуובה А.В., Шушканова Д.В. Ингибирование контрольных точек иммунитета при раке яичников. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(1):11–19. DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.11-19.  
Asaturova AV, Tregubova AV, Shushkanova DV. Inhibition of immunity control points in ovarian cancer. *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(1):11–19 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.11-19.
- Якупова Е.Р., Тугузбаева Г.М., Кабиров И.Р., Урманцев М.Ф., Насибуллин И.М., Усманов Э.Г. и др. Роль опухоляссоциированных макрофагов в патогенезе различных видов рака. Медицинский вестник Башкортостана. 2020;15(1(85)):79–87. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44091738> (получено 05.09.2022).

- Yakupova ER, Tuguzbaeva GM, Kabirov IR, Urmantsev MF, Nasibullin IM, Usmanov EG, Zabolotnyi OA.* Role of tumor-associated macrophages in the pathogenesis of various cancer species. *Bashkortostan Medical Journal.* 2020;15(1(85)):79–87 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44091738> (accessed 05.09.2022).
16. *Казакова А.Д., Ракина М.А., Ларионова И.В.* Фенотипическое разнообразие макрофагов при раке яичников. *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2022;57:109–130. DOI: 10.17223/19988591/57/6.  
*Kazakova AD, Rakina MA, Larionova IV.* Phenotypic diversity of macrophages in ovarian cancer. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2022;57:109–130 (In Russ.). DOI: 10.17223/19988591/57/6.
  17. *Cai H, Zhang Y, Wang J, Gu J.* Defects in macrophage reprogramming in cancer therapy: The negative impact of PD-L1/PD-1. *Front Immunol.* 2021;12:690869. DOI: 10.3389/fimmu.2021.690869.
  18. *Singhal S, Stadanlick J, Annunziata MJ, Rao AS, Bhojnagarwala PS, O'Brien S et al.* Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer. *Sci Transl Med.* 2019;11(479):eaat1500. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat1500.
  19. *Zhang J, Cao D, Yu S, Chen L, Wei D, Shen C et al.* Amphotericin B suppresses M2 phenotypes and B7-H1 expression in macrophages to prevent Raji cell proliferation. *BMC cancer.* 2018;18(1):467. DOI: 10.1186/s12885-018-4266-0.
  20. *Hartley GP, Chow L, Ammons DT, Wheat WH, Dow SW.* Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) signaling regulates macrophage proliferation and activation. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(10):1260–73. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.
  21. *Antonios JP, Soto H, Everson RG, Moughon D, Orpilla JR, Shin NP et al.* Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2017;19(6):796–807. DOI: 10.1093/neuonc/now287.
  22. *Zhang Y, Du W, Chen Z, Xiang C.* Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma. *Exp Cell Res.* 2017;359(2):449–57. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.028.
  23. *Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, Moskalenko M, Pacheco-Sanchez P, Yang Y et al.* Anti-PD-L1 treatment results in functional remodeling of the macrophage compartment. *Cancer Res.* 2019;79(7):1493–506. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3208.
  24. *Ma CJ, Ni L, Zhang Y, Zhang CL, Wu XY, Atia AN et al.* PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection. *Immunology.* 2011;132(3):421–31. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03382.x.
  25. *Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y et al.* Combined blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2018;78(17):5011–22. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0118.
  26. *Rao G, Latha K, Ott M, Sabbagh A, Marisetty A, Ling X et al.* Anti-PD-1 induces M1 polarization in the glioma microenvironment and exerts therapeutic efficacy in the absence of CD8 cytotoxic T-cells. *Clin Cancer Res.* 2020;26(17):4699–712. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-4110.
  27. *Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A, Wijkander J, Solterbeck A, Eriksson M et al.* Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int J Oncol.* 2017;51(1):104–14. DOI: 10.3892/ijco.2017.3996.
  28. *Liu Z, Kuang W, Zhou Q, Zhang Y.* TGF- $\beta$ 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int J Mol Med.* 2018;42(6):3395–403. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3923.
  29. *Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E.* Localized and reversible TGF $\beta$  signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009;11(11):1287–96. DOI: 10.1038/ncb1973.

### Информация об авторах

Анна Юрьевна Калининчук – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

Любовь Александровна Таширева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака 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

Anna Yu. Kalinchuk – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.  
<https://orcid.org/0000-0003-2106-3513>

Lyubov A. Tashireva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.  
<https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

Vladimir M. Perelmutter – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.  
<https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>



## Морфология лейкоцитов периферической крови у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)

Л.М. Сомова<sup>1</sup>, Е.И. Дробот<sup>1</sup>, Е.В. Пустовалов<sup>1,2</sup>, С.А. Абрамова<sup>1</sup>,  
Н.Г. Плехова<sup>3</sup>, А.И. Симакова<sup>3</sup>, С.А. Сокогутун<sup>3</sup>, А.О. Михайлов<sup>3</sup>,  
И.Н. Ляпун<sup>1</sup>, М.Ю. Щелканов<sup>1,2,4</sup>

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

<sup>2</sup> Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия

<sup>4</sup> ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

**Резюме.** *Введение.* Стремительное развитие пандемии COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, изначально свидетельствовало о значительном вовлечении в патологический процесс иммунной системы, включая лейкоциты периферической крови. Гематологические изменения были описаны уже при первых случаях COVID-19, тем не менее лишь в единичных работах сообщается о морфологических аномалиях клеток в мазках периферической крови. Цель настоящего исследования – охарактеризовать морфологию лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19, определить значение ее изменений в развитии дисфункции иммунной системы и для диагностики заболевания.

*Материалы и методы.* Исследована кровь 30 пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, находившихся на лечении в стационаре краевой клинической больницы № 2 Владивостока. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР-теста. Фиксированные в тетраоксиде осмия образцы лейкоконцентрата периферической крови были залиты в эпоксидную смолу с последующим приготовлением полутонких и ультратонких срезов.

*Результаты.* При световой и электронной микроскопии лейкоконцентрата периферической крови впервые у пациентов с коронавирусной инфекцией обнаружены кариопатологические изменения в нейтрофилах и моноцитах, составляющих базальный уровень иммунной системы. Эти изменения характеризовались ядерным дисморфизмом с появлением аномальных форм, отсутствующих у здоровых людей. Выявленные морфологические аномалии лейкоцитов следует рассматривать как признаки гипореактивности этих клеток, которые косвенно указывали на снижение их бактерицидного потенциала при COVID-19. При этом слабо визуализировалась секреторная дегрануляция нейтрофилов с выделением содержимого гранул во внеклеточное пространство, наблюдались сглаженность плазмалеммы лейкоцитов с малым числом микроворсинок, участвующих в захвате объектов фагоцитоза, отмечалось большое количество апоптотических лейкоцитов, у которых фагоцитарная способность редуцирована.

*Заключение.* Выявление морфологических аномалий циркулирующих лейкоцитов у пациентов с COVID-19 имеет диагностическое и прогностическое значение при данной патологии.

**Ключевые слова:** кровь, нейтрофилы, моноциты, морфология, COVID-19, SARS-CoV-2, кариопатологические изменения

**Для корреспонденции:** Лариса Михайловна Сомова. E-mail: l\_somova@mail.ru

**Для цитирования:** Сомова Л.М., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В., Абрамова С.А., Плехова Н.Г., Симакова А.И., Сокогутун С.А., Михайлов А.О., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Морфология лейкоцитов периферической крови у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Клиническая морфология. 2023;12(3):41–49. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.3.41-49.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 122041800135-3) при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60212 «Комплексный эколого-вирусологический мониторинг коронавирусов в экосистемах Дальнего Востока».

**Статья поступила** 11.01.2023. **Получена после рецензирования** 24.01.2023. **Принята в печать** 10.04.2023.

# Morphology of peripheral blood leukocytes in patients with new coronavirus infection (COVID-19)

L.M. Somova<sup>1</sup>, E.I. Drobot<sup>1</sup>, E.V. Pustovalov<sup>1,2</sup>, S.A. Abramova<sup>1</sup>,  
N.G. Plekhova<sup>3</sup>, A.I. Simakova<sup>3</sup>, S.A. Sokotun<sup>3</sup>, A.O. Mikhailov<sup>3</sup>,  
I.N. Lyapun<sup>1</sup>, M.Yu. Shchelkanov<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

<sup>3</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

<sup>3</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

<sup>4</sup> Federal Scientific Center of East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Vladivostok, Russia

**Abstract. Introduction.** The rapid spread of the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 initially indicated a significant immune system involvement, including peripheral blood leukocytes. Hematologic changes have already been described in the first cases of COVID-19; however, only few studies reported morphological cell abnormalities in peripheral blood smears. The aim of the study was to characterize the morphology of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19 and determine the significance of its changes in the immune system dysfunction and for the disease diagnosis.

**Materials and methods.** We studied blood samples of 30 patients infected by SARS-CoV-2 virus (confirmed with PCR tests) who were treated in Regional Clinical Hospital No. 2 in Vladivostok. Peripheral blood buffy coat samples fixed in osmium tetroxide were embedded in epoxy with subsequent preparation of semithin and ultrathin sections.

**Results.** To the best of our knowledge, it is the first study to show nuclear pathological changes in neutrophils and monocytes in blood buffy coat of the patients with coronavirus infection with light and electron microscopy of peripheral blood. We found cells with abnormal nuclear shape and leukocyte apoptotic degeneration absent in healthy individuals. The identified morphological leukocyte abnormalities should be considered as signs of hyporeactivity of these cells, which indirectly indicate a decrease in their bactericidal potential in COVID-19. At the same time, the secretory degranulation of neutrophils with the release of the contents of the granules into the extracellular space was poorly visualized. We observed smooth plasmalemma of leukocytes with a small number of microvilli involved in phagocytosis and numerous apoptotic leukocytes with reduced phagocytic ability.

**Conclusion.** The detection of morphological abnormalities of circulating leukocytes in patients with COVID-19 is of diagnostic and prognostic value in this pathology.

**Keywords:** blood, neutrophils, monocytes, morphology, COVID-19, SARS-CoV-2, karyopathological changes

**Corresponding author:** Larisa M. Somova. E-mail: l\_somova@mail.ru

**For citation:** Somova L.M., Drobot E.I., Pustovalov E.V., Abramova S.A., Plekhova N.G., Simakova A.I., Sokotun S.A., Mikhailov A.O., Lyapun I.N., Shchelkanov M.Yu. Morphology of peripheral blood leukocytes in patients with new coronavirus infection (COVID-19). Clin. exp. morphology. 2023;12(3):41–49 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.41-49.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (No. 122041800135-3) and was supported by the RFBR Project No. 20-04-60212 “Integrated ecological and virological monitoring of coronaviruses in the ecosystems of the Far East”.

**Received** 11.01.2023. **Received in revised form** 24.01.2023. **Accepted** 10.04.2023.

## Введение

Впервые изолированный в китайском городе Ухань (провинция Хубэй) в декабре 2019 года коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) продемонстрировал свой пандемический потенциал уже весной 2020 года, и с этого времени этиологически связанная с ним инфекция COVID-19 (Coronavirus disease 2019) остается наиболее актуальным инфекционным заболеванием во всем мире [1, 2]. Стремительное развитие пандемии COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, изначально свидетельствовало

о значительном вовлечении иммунной системы в патологический процесс, включая лейкоциты периферической крови [3]. Количественные гематологические изменения были описаны при первых исследованиях пациентов с болезнью, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Наиболее частые гематологические признаки включают лимфоцитопению [4–6], нейтрофилию [7–9], эозинопению [10, 11], легкую тромбоцитопению (35%) или, реже, тромбоцитоз [5].

Лишь в единичных работах сообщается о морфологических аномалиях клеток периферической крови [12–14], однако в доступной литературе нам

не удалось встретить работы об ультраструктурных исследованиях этих клеток. Абсолютное количество нейтрофилов часто повышалось ( $>5 \times 10^9/\text{л}$ ) в первые дни после поступления в стационар, до начала лечения или сразу после него с тенденцией к снижению через 1 неделю после этого ( $1,48\text{--}3,23 \times 10^9/\text{л}$ ). В ранней фазе нарастания симптомов, обычно совпадающей с госпитализацией, в периферической крови выявляли выраженную гранулоцитарную реакцию с незрелостью, дисморфизмом и апоптозно-дегенеративной морфологией [12–14].

Сообщается, что чувствительность и специфичность доступных в настоящее время диагностических методов сильно различаются [15]. Существуют различные проблемы с постановкой точного диагноза у пациентов с COVID-19, тем более что часть больных может быть бессимптомными носителями. В связи с этим изучение клеток периферической крови морфологическими методами у пациентов с COVID-19 может помочь в диагностике и, в некоторой степени, прогнозе заболевания. За эти изменения могут быть ответственны воспалительная реакция и вирусные эффекты на лейкоциты, которые возможно отслеживать в динамике заболевания. Учитывая патогенетическое значение иммунных нарушений при COVID-19, исследование морфофункциональных изменений клеток периферической крови имеет научное и практическое значение.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать морфологию лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19, определить значение ее изменений в развитии дисфункции иммунной системы и для диагностики заболевания.

## Материалы и методы

*Материал.* Для изучения морфологии циркулирующих лейкоцитов была взята кровь от 30 пациентов (18 женщин, 12 мужчин), инфицированных вирусом SARS-CoV-2, находившихся на лечении в стационаре красной клинической больницы № 2. Наличие коронавирусной инфекции (COVID-19) подтверждено с помощью ПЦР-теста. Диапазон возраста пациентов составил от 24 до 89 лет (средний возраст 61 год), из них до 30 лет – два пациента, 31–50 лет – три, 51–80 лет – 22, старше 80 лет – три пациента. При поступлении в стационар получено информированное добровольное согласие пациентов на медицинское вмешательство (приложение № 2 к приказу Минздрава России от 12.11.2021 № 1051н). На проведение морфологического исследования крови пациентов с COVID-19 получено разрешение локального этического комитета НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.11.2021).

*Методы.* Методической особенностью данной работы является исследование лейкоконцентрата периферической крови с использованием комплексного подхода, сочетающего световую микроскопию клеток

на полутонких срезах, окрашенных по Романовскому–Гимзе, и электронную микроскопию ультратонких срезов. Это позволило дать детальную морфологическую характеристику большого количества клеток, чем при исследовании мазков крови пациентов с COVID-19.

Получение лейкоконцентрата проводили по методике [16] в собственной модификации. В мерную центрифужную пробирку с антикоагулянтом (гепарин в количестве 5 единиц на 1 мл крови) брали самотеком 10 мл крови из локтевой вены, осторожно смешивали и помещали в термостат под углом  $45^\circ$  при температуре  $37^\circ$  на 20–30 минут. Верхний слой отделившийся 2–3 мл плазмы аккуратно отсасывали пастеровской пипеткой и удаляли. Нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку отбирали в чистую центрифужную пробирку, центрифугировали 7–10 минут со скоростью 800–1000 об./мин, при которой не происходит разрушение клеток. После центрифугирования надосадочную жидкость отсасывали из пробирки и получали осадок лейкоконцентрата с минимальным объемом жидкости для морфологического исследования.

Полученные образцы лейкоконцентрата фиксировали при комнатной температуре в течение 1 часа фиксатором Ито, содержащим растворы параформальдегида и пикриновой кислоты на 0,15 М фосфатном буфере, pH 7,3. Образцы трехкратно отмывали от фиксатора Ито 0,15 М фосфатным буфером, pH 7,3, путем центрифугирования по 15 минут каждый цикл, дофиксировали 1% раствором тетраоксида осмия ( $\text{OsO}_4$ ) в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем трехкратно отмывали от осмиевого фиксатора 0,15 М фосфатным буфером, pH 7,3, путем центрифугирования, по 15 минут каждый цикл.

Далее образцы лейкоконцентрата обезвоживали в  $50^\circ$  и  $70^\circ$  этаноле и заливали в эпоксидную смолу White resin, согласно инструкции производителя, в полихлорвиниловые капсулы. Для полимеризации смолы использовались два температурных режима:  $37^\circ\text{C}$  (в течение 1 суток),  $60^\circ\text{C}$  (в течение 2 суток). Для обработки материала применяли реактивы и эпоксидную смолу фирмы Sigma-Aldrich (США).

На ультрамикротоме LKB Bromma 2088 Ultrame V (Швеция) готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, которые помещали на предметные стекла и окрашивали метиленовым синим – азуром II – эозином (по Гимзе). Исследование окрашенных полутонких срезов проводили в световом микроскопе МИКМЕД-6 (ЛОМО, Россия) с компьютерным анализом видеоизображения. Ультратонкие срезы толщиной около 80 нм контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и дополнительно щелочным раствором 0,02% цитрата свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофотосъемку производили на фотопластинки для промышленных и научных целей размерами  $6 \times 9$  см ПФП-01Т («Славич», Россия).

## Результаты

При световой микроскопии полутонких срезов у всех обследованных пациентов с COVID-19 в периферической крови обнаружены морфологические изменения лейкоцитов (рис. 1, 2). У пациентов с COVID-19 среднее число морфологически измененных лейкоцитов, включая нейтрофилы и моноциты, составило 69%.

В нейтрофилах периферической крови выявлены отчетливые изменения формы ядра (рис. 1 А–С) и наличие двухъядерных клеток (рис. 1 D). Среди них встречались нейтрофилы с крупно- и мелковакуольной дегенерацией цитоплазмы (рис. 1 А, В, 2 А, В), вероятно, вследствие токсического действия вируса. В моноцитах крови, в норме имеющих эксцентрично расположенное бобовидное ядро [17], обнаружены аномальные формы ядра, имеющие глубокую вырезку (рис. 2 С). В части моноцитов, как и в нейтрофилах, обнаружена цитоплазматическая вакуолизация. Кроме того, к характерным изменениям клеток периферической крови при COVID-19 следует отнести апоптозную дегенерацию. Во многих полях зрения обнаруживались апоптотические лейкоциты (рис. 2 D), в цитоплазме которых были видны округлые фрагменты конденсированного ядерного хроматина. Таким образом, выявленные изменения лейкоцитов периферической крови пациентов с COVID-19 можно трактовать как патоло-

гические (дегенеративные) формы, индуцированные коронавирусом SARS-CoV-2.

Исследование субмикроскопической организации эукариот дает возможность углубленного понимания сущности и механизмов патологических изменений клеток при различных заболеваниях, в том числе при вирусных инфекциях. В нашей работе впервые изучена ультраструктура лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19, что позволило детализировать аномалии этих клеток, вызванные коронавирусом SARS-CoV-2, и оценить их патогенетическое значение.

Установлено, что в ядрах как нейтрофилов, так и моноцитов преобладал транскрипционно неактивный (конденсированный) хроматин, расположенный под ядерной оболочкой (плазмалеммой) (рис. 3 А, В). Это указывало на то, что коронавирус SARS-CoV-2 не вызывал отчетливого стимулирующего действия на циркулирующие лейкоциты крови. При этом на поверхности наружной цитоплазматической мембраны лейкоцитов наблюдалась редукция микроворсинок с наличием лишь единичных выростов цитоплазмы (рис. 3 В). Цитоплазма нейтрофилов плотно заполнена секреторными гранулами (рис. 5). Однако в наших исследованиях при коронавирусной инфекции в нейтрофилах периферической крови не удалось визуализировать экзоцитоз

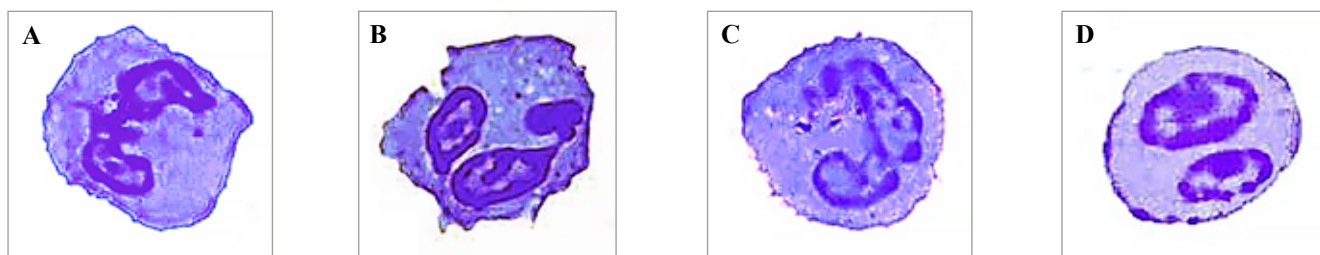


Рис. 1. Морфологическая аномалия лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19. А–С – нейтрофилы с сегментированным ядром причудливой формы, D – двухъядерный нейтрофил,  $\times 1000$ . Полутонкий срез, окраска по Гимзе

Fig. 1. Morphological abnormality of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19. A–C – neutrophils with a bizarre segmented nucleus, D – binuclear neutrophil,  $\times 1000$ . Semi-thin section, Giemsa stain

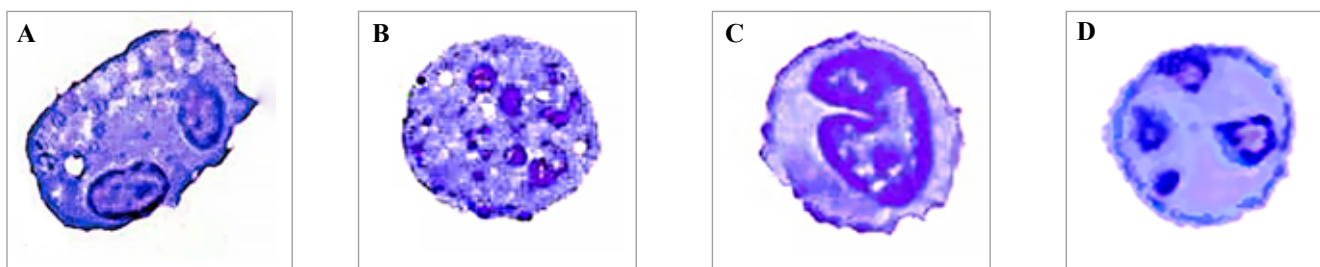
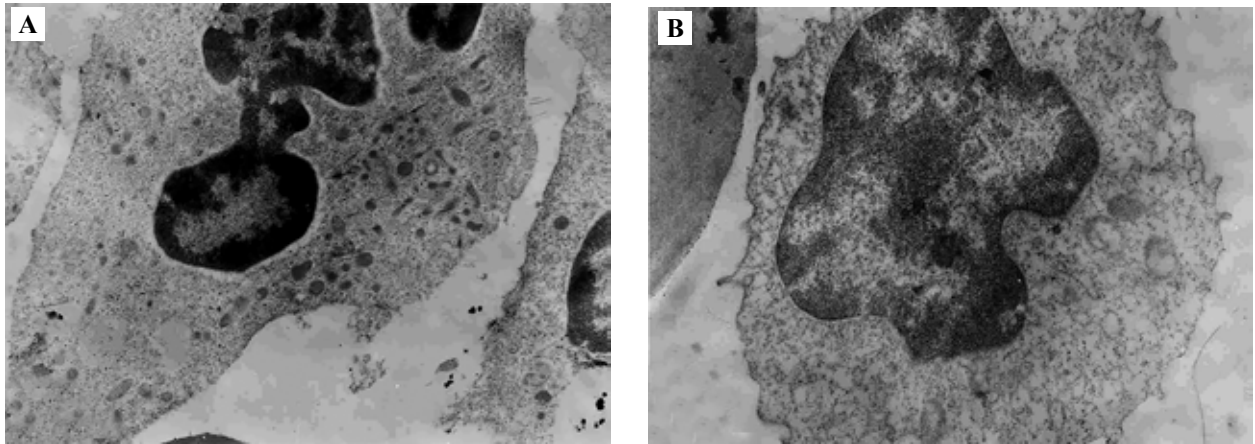


Рис. 2. Морфологическая аномалия лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19. А – двухъядерный нейтрофил с вакуолизированной цитоплазмой, В – нейтрофил с кариорексисом и мелковакуольной дегенерацией, С – моноцит с ядром неправильной формы, D – апоптотический лейкоцит. Полутонкий срез, окраска по Гимзе,  $\times 1000$

Fig. 2. Morphological abnormality of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19. A – binuclear neutrophil with vacuolated cytoplasm, B – neutrophil with karyorrhexis and small vacuolar degeneration, C – monocyte with an irregular nucleus, D – apoptotic leukocyte. Semi-thin section, Giemsa stain,  $\times 1000$

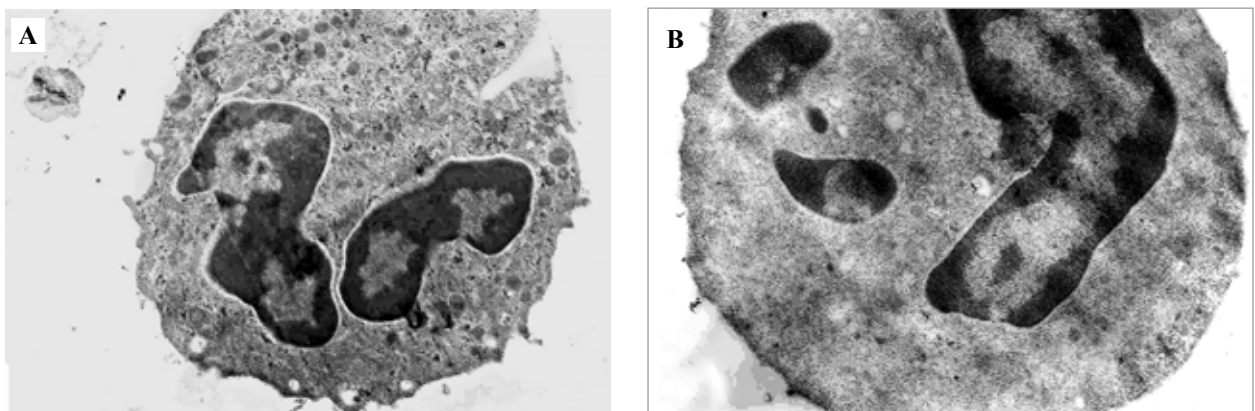


*Рис. 3.* Ультраструктура лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19.

А – нейтрофил с ядром аномальной формы, маргинальным конденсированным хроматином,  $\times 6000$ ,  
 В – моноцит с ядром аномальной формы и преобладанием конденсированного, неактивного хроматина;  
 отсутствие псевдоподий на поверхности плазмалеммы,  $\times 8000$ . ТЭМ

*Fig. 3.* Ultrastructure of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19.

А – a neutrophil with an abnormal nuclear shape, marginal condensed chromatin,  $\times 6000$ , В – a monocyte with an abnormal nuclear shape and a predominance of condensed inactive chromatin; the absence of pseudopodia on the surface of the plasmalemma,  $\times 8000$ . TEM



*Рис. 4.* Ультраструктура лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19.

А, В – нейтрофилы с аномальной формой ядра, редукцией микроворсинок на плазмалемме. ТЭМ, А –  $\times 8000$ , В –  $\times 10\ 000$

*Fig. 4.* Ultrastructure of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19.

А, В – neutrophils with an abnormal nuclear shape, reduction in microvilli on the plasmalemma. TEM, А –  $\times 8000$ , В –  $\times 10\ 000$

гранулярного содержимого во внеклеточное пространство с появлением запустевших гранул. Это позволяет предположить нарушение одной из важных эффекторных функций нейтрофилов, а именно секреторной дегрануляции, обычно сопутствующей респираторному взрыву. В части клеток выявлена вакуолизация цитоплазмы разной степени выраженности (рис. 5).

При электронной микроскопии лейкоконцентрата периферической крови пациентов с COVID-19 также обращало на себя внимание наличие большого количества клеток с измененной формой ядра (рис. 4) и апоптотических лейкоцитов, содержащих однотипные по размерам фрагменты ядерной ДНК (рис. 6). Таким образом, электронномикроскопические исследования ультратонких срезов лейкоконцентрата

периферической крови пациентов с COVID-19 показали, что выявленные морфологические аномалии лейкоцитов можно рассматривать как маркеры гипореактивности этих клеток со снижением их бактерицидного потенциала. К ним отнесены 1) нарушение секреторной дегрануляции нейтрофилов, при которой обычно происходит выделение содержимого гранул во внеклеточное пространство и проявляется его бактерицидное действие на нефагоцитированные микроорганизмы; 2) сглаженность плазмалеммы лейкоцитов с малым числом микроворсинок – цитоплазматических выростов на поверхности лейкоцитов, участвующих в захвате объектов фагоцитоза; 3) большое количество апоптотических лейкоцитов, у которых фагоцитарная способность редуцирована.

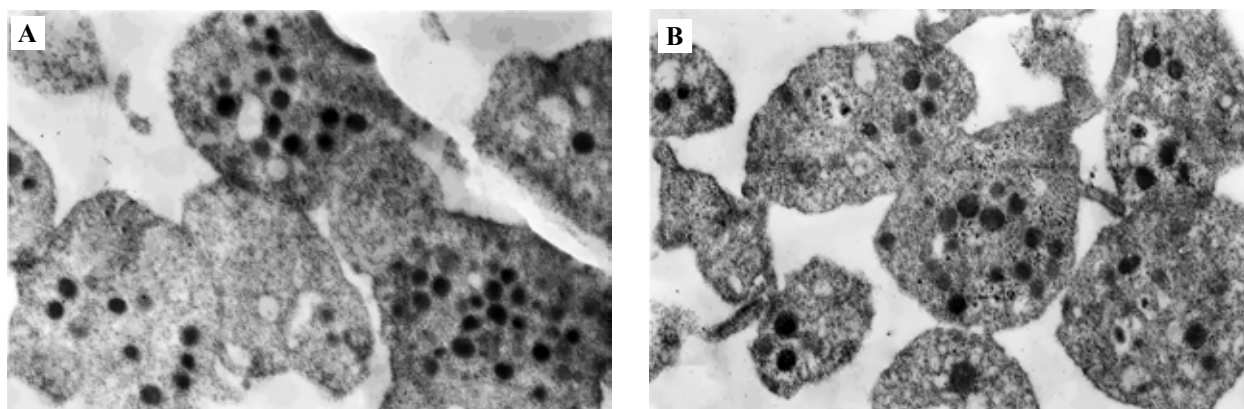


Рис. 5. Ультраструктура лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19.

А, В – характерные секреторные гранулы в цитоплазме нейтрофилов без явных проявлений экзоцитоза их содержимого во внеклеточное пространство, вакуолизация цитоплазмы. ТЭМ, А –  $\times 10\,000$ , В –  $\times 8000$

Fig. 5. Ultrastructure of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19.

А, В – characteristic secretory granules in the cytoplasm of neutrophils without obvious manifestations of exocytosis of their contents into the extracellular space, vacuolization of the cytoplasm. TEM, А –  $\times 10\,000$ , В –  $\times 8000$

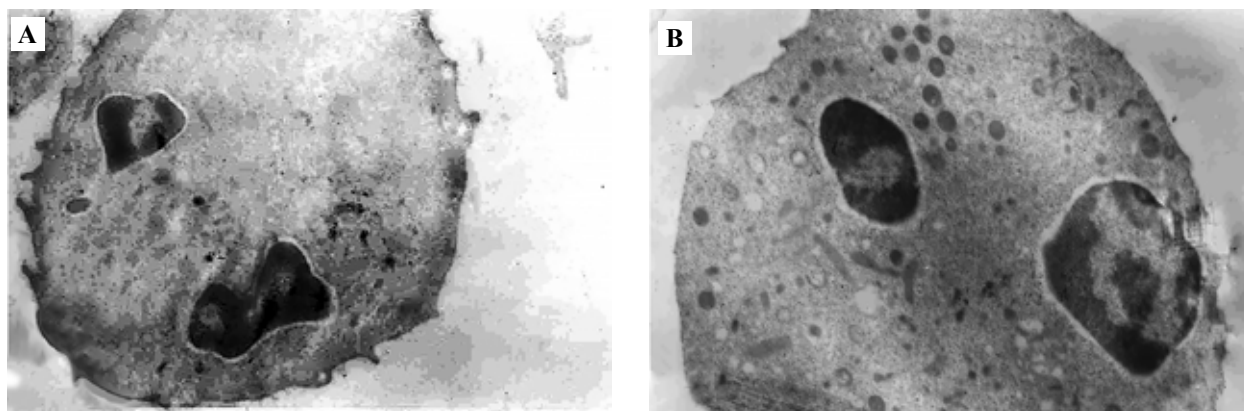


Рис. 6. Ультраструктура лейкоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19.

А, В – апоптотические лейкоциты, в цитоплазме которых видны ядерные фрагменты. ТЭМ, А –  $\times 6000$ , В –  $\times 8000$

Fig. 6. Ultrastructure of peripheral blood leukocytes in patients with COVID-19.

А, В – apoptotic leukocytes, in the cytoplasm of which there are nuclear fragments. TEM, А –  $\times 6000$ , В –  $\times 8000$

## Обсуждение

Нейтрофилы и моноциты/макрофаги являются ключевыми клетками воспаления при инфекционных болезнях и как профессиональные фагоциты вносят вклад в защиту хозяина от инфекционных агентов, удаляя патогены, мертвые клетки и клеточный детрит во время воспаления [18, 19]. За последние два десятилетия взгляд на нейтрофильные лейкоциты (гранулоциты) претерпел изменения и значительно расширился [20, 21]. На сегодняшний день доказано, что нейтрофилы участвуют в инициации, модуляции, регулировании и разрешении реакций врожденного и адаптивного иммунитета через прямые (путем межклеточного контакта) и опосредованные (через продукцию цитокинов и других биологически активных медиаторов) механизмы. При этом отмечаются функциональная и фенотипическая гетерогенность и пластичность этих клеток [22–24]. Недавно стало известно [25], что в за-

висимости от тканевого микроокружения моноциты/макрофаги могут приобретать разный фенотип, что обуславливает их провоспалительную (M1 фенотип) или противовоспалительную (M2 фенотип) активность. Сообщается, что у пациентов с COVID-19 на тяжелых стадиях заболевания наступает моноцитопения и появляются крупные моноциты с вакуолизированной цитоплазмой [26], что, вероятно, свидетельствует о деструктивном воздействии SARS-CoV-2 на моноциты [27].

Стимуляция патогенами радикально меняет метаболический профиль нейтрофилов [28]. К наиболее ярким проявлениям реактивности нейтрофилов относится респираторный взрыв, который обычно сопутствует фагоцитозу патогенов. Однако в нашем исследовании морфологические изменения лейкоцитов при COVID-19 свидетельствуют о гипореактивности этих клеток, на что указывают отмеченные выше маркеры. Выявленные аномалии лейкоцитов в целом согласуются с данными

зарубежных авторов, исследовавших мазки крови пациентов с этой инфекцией [12, 14]. В начальные сроки инфекции, совпадающие с госпитализацией пациентов, в препаратах лейкоконцентрата обращали на себя внимание аномальные формы лейкоцитов [17].

В начале 2000-х годов особое место заняла проблема кариопатологических (ядерных) изменений в иммунокомпетентных клетках, вызванных факторами инфекционной природы [29]. При инфекциях именно эти клетки поражаются в первую очередь, поэтому ядерные аномалии играют ключевую роль в последствиях инфекционного процесса. В своей работе И.Н. Ильинских и соавторы комплексно изучили цитологические изменения интерфазных ядер, митотического режима и кариотипа иммунокомпетентных клеток в условиях *in vivo* и *in vitro* и показали, что не только инфекционные вирусы, являющиеся внутриклеточными патогенами, но и живые вирусные вакцины вызывают кариопатологические (хромосомные) изменения в лимфоцитах крови человека и животных, что сопровождается иммунодепрессивным состоянием организма [29]. Кариопатологические изменения возникают в первые дни после начала инфекционного процесса, вызываемого многими вирусами, и постепенно исчезают на протяжении 1–3 месяцев после выздоровления.

При этом авторы не касались различий кариопатологических изменений в клетках при разных заболеваниях. В доступной литературе мы также не обнаружили таких данных. Тем не менее в работах о морфологических аномалиях клеток периферической крови при COVID-19 [12–14] авторы отмечают клинико-диагностическую и прогностическую значимость этих изменений, что требует дальнейших исследований. В этом плане особый интерес представляет сообщение А. Singh et al. [14], в котором обнаружены специфические морфологические изменения нейтрофилов периферической крови называют ядрами COVID.

Много дискуссий ведется о значении нейтрофилов в противовирусном иммунитете. Показаны взаимозависимость и функциональная кооперация разнотипных эффекторных механизмов, выполняющих общую задачу в рамках системы иммунологического надзора [21, 22]. Стимулированный патогенами нейтрофил воспринимается как важнейший эффектор гомеостаза, который включается в реализацию защитных функций и клинически значимых осложнений воспалительного процесса. Деактивация, которой завершаются многие реакции нейтрофила, обязательно связана с истощением клеток. Несомненно, дефекты фагоцитоза служат одним из реальных факторов, запускающих «иммунодефицитный процесс», что подтверждают полученные нами результаты о морфологии циркулирующих лейкоцитов при COVID-19.

## Заключение

В проведенной работе у пациентов с коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, нами впервые с использованием электронной микроскопии

показаны кариопатологические изменения в нейтрофилах и моноцитах периферической крови, характеризующих уровень врожденного иммунитета. Выявленные морфологические аномалии лейкоцитов периферической крови, вероятно, могут лежать в основе депрессии их бактерицидного потенциала при коронавирусной инфекции. Полученные результаты указывают на клинико-диагностическую и прогностическую значимость выявления морфологических аномалий циркулирующих лейкоцитов у пациентов с COVID-19.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Сомова.  
Сбор материала – А.И. Симакова, С.А. Сокотун, А.О. Михайлов.  
Обработка материала – Е.И. Дробот, С.А. Абрамова, Л.М. Сомова, Е.В. Пустовалов, Н.Г. Плехова, И.Н. Ляпун.  
Написание текста – Л.М. Сомова.  
Редактирование – Л.М. Сомова, М.Ю. Щелканов.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Somova.  
Collected the data – A.I. Simakova, S.A. Sokotun, A.O. Mikhailov.  
Processed the data – E.I. Drobot, S.A. Abramova, L.M. Somova, E.V. Pustovalov, N.G. Plekhova, I.N. Lyapun.  
Wrote the paper – L.M. Somova.  
Edited the manuscript – L.M. Somova, M.Yu. Shchelkanov.

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

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

## Литература/References

- Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекция и иммунитет. 2020;10(2):221–246. DOI: 10.15789/2220-7619-NOI-1412.  
*Shchelkanov MYu, Popova AYu, Dedkov VG, Akimkin VG, Maleev VV.* History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2020;10(2):221–246 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-NOI-1412.
- Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. COVID-19: этиология, клиника, лечение. Инфекция и иммунитет. 2020;10(3):421–445. DOI: 10.15789/2220-7619-CEC-1473.  
*Shchelkanov MYu, Kolobukhina LV, Burgasova OA, Kruzhkova IS, Maleev VV.* COVID-19: etiology, clinical picture, treatment. Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2020;10(3):421–445 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-CEC-1473.
- Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.

- Somova LM, Kotsyurbiy EA, Drobot EI, Lyapun IN, Shchelkanov MYu.* Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):11–20 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.
4. *Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
  5. *Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846–8. DOI: 10.1007/s00134-020-05991-x.
  6. *Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L et al.* Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis.* 2020;221(11):1762–9. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.
  7. *Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507–13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
  8. *Mo P, Xing Y, Xiao Y, Deng L, Zhao Q, Wang H et al.* Clinical characteristics of refractory COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;73(11):e4208–13. DOI: 10.1093/cid/ciaa270.
  9. *Qian GQ, Yang NB, Ding F, Ma AHY, Wang ZY, Shen YF et al.* Epidemiologic and clinical characteristics of 91 hospitalized patients with COVID-19 in Zhejiang, China: A retrospective, multi-centre case series. *QJM.* 2020;113(7):474–81. DOI: 10.1093/qjmed/hcaa089.
  10. *Liu F, Xu A, Zhang Y, Xuan W, Yan T, Pan K et al.* Patients of COVID-19 may benefit from sustained Lopinavir-combined regimen and the increase of eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression. *Int J Infect Dis.* 2020;95:183–91. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.03.013.
  11. *Zhang JJ, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy.* 2020;75(7):1730–41. DOI: 10.1111/all.14238.
  12. *Zini G, Bellesi S, Ramundo F, d'Onofrio G.* Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am J Hematol.* 2020;95(7):870–2. DOI: 10.1002/ajh.25824.
  13. *Мишура Л.Г., Ногина Р.Г., Липова В.А., Гайковская Л.Б.* Особенности изменения морфологии клеток периферической крови и выпотных жидкостей у пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(S4):45. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=45607844> (получено 09.01.2023).  
*Mishura LG, Nogina RG, Lipova VA, Gaykovaya LB.* Features of changes in the morphology of peripheral blood cells and effusion fluids in patients with a new coronavirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2021;66(S4):45 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=45607844> (accessed 09.01.2023).
  14. *Singh A, Sood N, Narang V, Goyal A.* Morphology of COVID-19-affected cells in peripheral blood film. *Brit Med J Case Rep.* 2020;13(5):e236117. DOI: 10.1136/bcr-2020.
  15. *Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M et al.* Diagnostic testing for severe acute respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A narrative review. *Ann Intern Med.* 2020;172(11):726–34. DOI: 10.7326/M20-1301.
  16. *Карпищенко А.И., Андреев В.А., Антонов В.Г., Асеев М.В., Баранов В.С., Берестовская В.С. и др.* Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 692 с.  
*Karpishchenko AI, Andreev VA, Antonov VG, Aseev MV, Baranov VS, Berestovskaya VS et al.* Medical laboratory diagnostics: programs and algorithms. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 692 p. (In Russ.).
  17. *Андерсон Ш.К., Поулсен К.Б.* Атлас гематологии. Пер. с англ. / Под ред. В.П. Сапрыкина. Москва: Логосфера, 2007. 608 с.  
*Anderson SC, Poulsen KB.* Atlas of Hematology. Transl. from Eng. / Ed. by V.P. Saprykin. Moscow: Logosfera, 2007. 608 p. (In Russ.).
  18. *Kolaczowska E, Kubes P.* Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159–75. DOI: 10.1038/nri3399.
  19. *Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA.* The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
  20. *Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К.* Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы. Инфекция и иммунитет. 2019;9(1):9–38. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38.  
*Dolgushin II, Mezentseva EA, Savochkina AYU, Kuznetsova EK.* Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet.* 2019;9(1):9–38 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38.
  21. *Johansson C, Kirsebom FCM.* Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunol.* 2021;14(4):815–27. DOI: 10.1038/s41385-021-00397-4.
  22. *Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтаидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. и др.* Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2. Инфекция и иммунитет. 2018;8(1):7–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.  
*Nesterova IV, Kolesnikova NV, Chudilova GA, Lomtadze LV, Kovaleva SV, Evglevsky AA et al.* The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet.* 2018;8(1):7–18 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
  23. *Perobelli SM, Galvani RG, Goncalves-Silva T, Xavier CR, Nobrega A, Bonomo A.* Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(8):665–75. DOI: 10.1590/1414-431X20154524.
  24. *Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O.* Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* 2016;127(18):2173–81. DOI: 10.1182/blood-2016-01-688887.
  25. *Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф.* Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека. Вестник Российской академии медицинских наук. 2015;70(1):26–31. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1228.  
*Sakharov VN, Litvitsky PF.* Roles of different macrophage phenotypes in the pathogenesis of some human diseases. *Annals of*



- the Russian Academy of Medical Sciences. 2015;70(1):26–31 (In Russ.). DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1228.
26. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y et al. Front-line science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2021;109(1):13–22. DOI: 10.1002/JLB.4HI0720-470R.
27. Kazancioglu S, Yilmaz FM, Bastug A, Sakalli A, Ozbay BO, Buyuktarakci C et al. Lymphocyte subset alteration and monocyte CD4 expression reduction in patients with severe COVID-19. *Viral Immunol.* 2021;34(5):342–51. DOI: 10.1089/vim.2020.0166.
28. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Неважай Т.А., Полутов Н.В. Морфофункциональные и метаболические особенности гранулоцитов периферической крови. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015;4(2):285–9. Доступно по адресу: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=6636> (получено 09.01.2023).
- Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Неважай Т.А., Полутов Н.В. Morphofunctional and metabolic features of peripheral blood granulocytes. *International Journal of Applied and Fundamental Research.* 2015;4(2):285–9 (In Russ.). Available from: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=6636> (accessed 09.01.2023).
29. Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ткаченко С.Б. Инфекционная кариопатология. Томск: Издательство Томского университета, 2005. 168 с. Ilyinskikh IN, Novitsky VV, Ilyinskikh EN, Ilyinskikh NN, Tkachenko SB. *Infectious karyological pathology.* Tomsk: Tomsk University Press, 2005. 168 p.

### Информация об авторах

Лариса Михайловна Сомова – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

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

Евгений Вячеславович Пустовалов – доктор физико-математических наук, ведущий инженер лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, профессор департамента информационных и компьютерных систем Дальневосточного федерального университета.

Светлана Алексеевна Абрамова – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Наталья Геннадьевна Плехова – доктор биологических наук, доцент, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Анна Ивановна Симакова – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Светлана Анатольевна Сокотун – кандидат медицинских наук, доцент кафедры инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Александр Олегович Михайлов – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета.

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

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

### Author information

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

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

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

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

Evgeny V. Pustovalov – Dr. Sci. (Phys. and Math.), Leading Engineer, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Software and Computer Systems, Far Eastern Federal University.

<http://orcid.org/0000-0003-1036-3975>

Svetlana A. Abramova – Junior Researcher, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Natalya G. Plekhova – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Central Scientific Research Laboratory, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>

Anna I. Simakova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3334-4673>

Svetlana A. Sokotun – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-3807-3259>

Alexander O. Mikhailov – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-2719-3629>

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

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

Mikhail Yu. Shchelkanov – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Director of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology; Head of the Department of Epidemiology, Microbiology and Parasitology, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University; Head of the Virology Laboratory, Federal Scientific Center of East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences.

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

## Профили астроцитарной дифференцировки переднего мозга человека на внутриутробном этапе онтогенеза

А.С. Харламова<sup>1</sup>, Е.Г. Отлыга<sup>1</sup>, О.С. Годовалова<sup>2</sup>, О.А. Юнеман<sup>1</sup>, С.В. Савельев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии, Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Функционирование зрелого мозга человека наряду с собственно нервными клетками обеспечивают популяции макроглиальных клеток – астроцитов и олигодендроцитов. При общем дефиците первичных данных о развитии мозга человека тематика глиогенеза в целом является вторичной по сравнению с вопросом кортикального нейрогенеза. Пределы нормы и пространственно-временные паттерны глиальной дифференцировки в случае созревания переднего мозга человека остаются малоизученными. Целью работы является описание общей динамики распределения астроцитарных популяций в развивающемся переднем мозге человека.

*Материалы и методы.* Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына. Для иммуноморфологического исследования были отобраны полушария головного мозга от 37 плодов человека на сроках от 8 недель после оплодотворения до рождения.

*Результаты.* Приведены пилотные данные сравнительного иммуноморфологического исследования переднего мозга плодов человека с астроцитарными маркерами (GFAP, ALDH1L1, FABP-7) на разных этапах внутриутробного развития. Созревание и специфическая дифференцировка астроцитарной популяции переднего мозга человека начинается не позднее рубежа префетального и раннего фетального периода (12–13 недель гестации). Вопрос о полной гомологичности GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> астроцитарных популяций подкорковых и провизорных (транзиторных) корковых структур переднего мозга на пренатальном этапе онтогенеза остается открытым. Распределение GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> глиобластов в провизорных зонах стенок полушарий не исключает происхождение волокнистых астроцитов из дорсальных пролиферативных зон переднего мозга. Сравнительный иммуноморфологический анализ распределения FABP-7<sup>+</sup>нейробластов в переднем мозге плодов человека ставит под вопрос принадлежность FABP-7 клеток к астроцитарной популяции на внутриутробном этапе развития человека.

*Заключение.* Закономерности пространственно-временного распределения исследованных маркеров в развивающемся переднем мозге человека отличаются, что свидетельствует о гетерогенности астроцитарной популяции уже в раннем онтогенезе человека.

**Ключевые слова:** развитие мозга человека, передний мозг, глиальная дифференцировка, астроциты, астроцитарные маркеры, GFAP, ALDH1L1, FABP-7

**Для корреспонденции:** Анастасия Сергеевна Харламова. E-mail: grossulyar@gmail.com

**Для цитирования:** Харламова А.С., Отлыга Е.Г., Годовалова О.С., Юнеман О.А., Савельев С.В. Профили астроцитарной дифференцировки переднего мозга человека на внутриутробном этапе онтогенеза. Клини. эксп. морфология. 2023;12(3):50–63. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.50-63.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-25-00370.

Статья поступила 18.01.2023. Получена после рецензирования 02.02.2023. Принята в печать 10.04.2023.

## Astrocyte lineage differentiation profiles of the fetal human telencephalon

A.S. Kharlamova<sup>1</sup>, E.G. Otylga<sup>1</sup>, O.S. Godovalova<sup>2</sup>, O.A. Junemann<sup>1</sup>, S.V. Saveliev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Brain functioning is kept by both neuronal cell activity and macroglia, i.e., astrocytes and oligodendrocytes. The current data on the prenatal development of the human brain are scarce, and gliogenesis is less studied than cortical neurogenesis. Normal limits and variations and spatiotemporal patterns of glial differentiation in human brain development remain poorly studied.

*Materials and methods.* We used human fetal autopsy samples from the Collection of the Laboratory of Nervous System Development of Avtsyn Research Institute of Human Morphology. For immune and morphological analysis, samples of 38 fetal cerebral hemispheres at stages from 8 postconceptional weeks to birth were chosen.

*Results.* We provided the results of the pilot comparative immune and morphological study with the panel of markers (GFAP, ALDH1L1, FABP-7) of the fetal human telencephalon in prenatal ontogenesis. Specific differentiation and maturation of the astrocyte population on the telencephalon start before early fetal period (12–13 gestational weeks). GFAP<sup>+</sup> and ALDH1L1<sup>+</sup> astrocyte populations in early human telencephalon are still to be studied for their homology. Analysis of GFAP<sup>+</sup> and ALDH1L1<sup>+</sup> glioblast distribution proposes dorsal proliferative zone as a source for fibrous cortical astrocytes. Comparative immune and morphological analysis of FABP-7<sup>+</sup> neuroblasts in the fetal telencephalon questions whether FABP-7 cells belong to astrocyte population at early prenatal human ontogenesis.

*Conclusion.* In the telencephalon, temporal and/or spatiotemporal translational profiles of these three antigens differ, which indicates that the astrocyte population is heterogeneous in early ontogenesis.

**Keywords:** human brain development, telencephalon, glial differentiation, astrocytes, astrocyte fate lineage, GFAP, ALDH1L1, FABP-7

**Corresponding author:** Anastasia S. Kharlamova. E-mail: grossulyar@gmail.com

**For citation:** Kharlamova A.S., Otyga E.G., Godovalova O.S., Junemann O.A., Saveliev S.V. Astrocyte lineage differentiation profiles of the fetal human telencephalon. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):50–63 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.50-63.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-25-00370.

**Received** 18.01.2023. **Received in revised form** 02.02.2023. **Accepted** 10.04.2023.

## Введение

Основными клеточными популяциями мозга человека кроме собственно нервных клеток являются астроциты и олигодендроциты. Астроцитарная глия участвует не только в обменных процессах центральной нервной системы и формировании гематоэнцефалического барьера, но и в синаптогенезе, синаптических перестройках и модуляции синаптической передачи, регулирует направление прорастания аксонов, обеспечивает регенераторный потенциал центральной нервной системы при ишемических и других повреждениях [1–6]. Астроцитарная недостаточность вовлечена в патогенез целого ряда заболеваний нервной системы [7–9]. При этом в ситуации общего дефицита первичных данных о развитии мозга человека тематика глиогенеза в целом остается вторичной по сравнению с вопросом кортикального нейрогенеза [2]. Общие процессы и молекулярные особенности миграции и дифференцировки нейро- и глиобластов изучаются в основном в модельных исследованиях. Однако результаты модельных экспериментов далеко не всегда справедливы для человека и могут серьезно отличаться между видами. Пределы нормы и пространственно-временные паттерны глияльной дифференцировки в случае созревания переднего мозга человека остаются малоизученными. Кроме того, корковые и подкорковые территории переднего мозга неоднородны, и темпы созревания в различных областях переднего мозга также гетерогенны. Вопрос гетерохроний глиогенеза в мозге человека остается открытым. Морфология, профили экспрессии и, соответственно, функциональные особенности астроцитов могут существенно отличаться в зависимости от ло-

кализации как между крупными регионами головного мозга, так и в их пределах [2, 10].

Известно, что у млекопитающих дорсальная популяция клеток-предшественников переднего мозга – радиальные предшественники вентрикулярной и субвентрикулярной зоны – является источником проекционных нейронов и астроцитов коры, а вентральная – клетки-предшественники желудочковых возвышений (или ганглиозных бугров) и интерпедункулярной зоны (септальная прижелудочковая зона – вставочных нейронов коры и олигодендроглии (у грызунов отдельно иногда выделяют подмозолистую зону пролиферации [11]), а также всех популяций клеток подкорковых ядер. При этом функциональные возможности и созревание астроцитарных клеток имеют свои региональные и временные особенности. В переднем мозге млекопитающих принято выделять протоплазматические астроциты серого вещества, волокнистые астроциты белого вещества и наиболее рано дифференцирующуюся популяцию астроцитов маргинальной зоны коры. Для протоплазматических астроцитов коры у млекопитающих показано два глиогенных источника: 1) желудочковые возвышения, 2) вентрикулярная и субвентрикулярная зоны стенки полушарий. На модельных видах выявлено, что астробласты белого вещества и олигодендробласты, как и предшественники интернейронов коры, мигрируют тангенциально из области желудочковых возвышений, пересекая гистогенетические юниты, выделяемые в прозометрической модели развития мозга [12, 13]. Для волокнистых астроцитов происхождение не из подкорковых герминативных зон пока не подтверждено, хотя и не исключается [14], тог-

да как для астробластов и олигодендробластов, а также вставочных нейронов обонятельных луковиц серого вещества предполагается общий источник для поздней дифференцировки (после раннего фетального периода) из когорты промежуточных радиальных клеток [15]. Клетки-предшественники и дифференцирующиеся астробласты выделяют по профилям экспрессии/трансляции. Сложность оценки астроглиальной дифференцировки заключается в том, что не существует универсального панастроцитарного антигена, характерного для всех областей мозга на всех стадиях развития [16–18].

Одним из наиболее распространенных маркеров астроцитов как в модельных исследованиях, так и в работах на аутопсийном и биопсийном материале человека, включая плодный, являются антитела к глиальному кислому фибриллярному белку (GFAP) – маркеру зрелой астроцитарной глии [16, 19]. В мозге взрослых млекопитающих антитела к GFAP выявляют в основном астроциты белого вещества. Антитела к альдегиддегидрогеназе L1 (ALDH1L1) были предложены как более удачный панастроцитарный маркер, специфичный как для волокнистых, так и для протоплазматических астроцитов в мозге взрослых млекопитающих [20]. В развивающемся мозге млекопитающих экспрессия GFAP также отмечается для клеток радиальной глии, однако способность антител выявлять белок зависит от конкретного производителя: используемые в данной работе антитела не выявляют радиальные клетки и их отростки тотально, но могут маркировать поздние радиальные предшественники. Кроме того, для изучения развивающегося мозга человека и особенно для типирования отдельных субпопуляций клеток основных линий дифференцировки нервной системы потенциально могут быть перспективны не только панастроцитарные

маркеры, но и маркеры, идентифицирующие только часть популяции, в данном случае астроцитарной. Антигеном, выявление которого может быть связано с астроцитарной дифференцировкой переднего мозга, является так называемый brain-fatty acid-binding protein (FABP-7) – один из трех белков семейства, связывающих жирные кислоты и, как считается, вовлеченный в раннее развитие мозга человека. Предполагается, что он участвует в формировании специфического распределения радиальной глии и, соответственно, миграции нейробластов, а также есть данные о его участии в пролиферации реактивных астроцитов, но не их миграции [21]. Кроме того, повышение экспрессии FABP-7 наблюдается при синдроме Дауна [22] и шизофрении [23]. По данным BPR (brainproteinatlas.org), белок экспрессируется субпопуляцией глиальных клеток в пределах новой коры, гиппокампа и подкорковых ядрах переднего мозга взрослого человека. В раннем онтогенезе, по данным литературы, FABP-7 считается панастроцитарным маркером, также характерным для радиальных клеток-предшественников, включая предшественники линии олигодендроглии [15, 17].

Целью работы является описание общих закономерностей распределения астроцитарных популяций клеток, выделенных с помощью специфических глиальных маркеров, в развивающемся переднем мозге плодов человека на разных стадиях внутриутробного онтогенеза.

## Материалы и методы

Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (табл.).

Таблица | Table

Характеристики использованного материала | Characteristics of the material used

№.	Пол   Sex	Возраст (неделя)*   Age (gw)*	Фиксация   Fixation	Вес (г)   Weight (g)	КТР/рост (мм)   CRL/height (mm)
1	–	9,5 (8 pcw)	Формалин   Formalin	–	23,5
2	–	10 (8 pcw)	Формалин   Formalin	–	30
3	–	10,5 (8,5 pcw)	Формалин   Formalin	–	38
4	–	11 (9 pcw)	Формалин   Formalin	–	45
5	–	11 (9 pcw)	Формалин   Formalin	6,9	45
6	–	11 (9,5 pcw)	Формалин   Formalin	–	48
7	–	11 (9,5 pcw)	Формалин   Formalin	–	49
8	–	11,5 (10 pcw)	Формалин   Formalin	–	59
9	–	13,5	Формалин   Formalin	28	80/–
10	–	14	Формалин   Formalin	36	83/115

Окончание таблицы | Table (ended)

No.	Пол   Sex	Возраст (недель)*   Age (gw)*	Фиксация   Fixation	Вес (г)   Weight (g)	КТР/рост (мм)   CRL/ height (mm)
11	–	14,5	Формалин   Formalin	66	95/135
12	М   М	14	Формалин   Formalin	60	100/140
13	Ж   F	15	Формалин   Formalin	89	107/162
14	–	16	Формалин   Formalin	–	–
15	–	16,5	Формалин   Formalin	127	138/–
16	–	17	Формалин   Formalin	142	145/–
17	Ж   F	18	Формалин   Formalin	170	140/210
18	М   М	18,5	Формалин   Formalin	175	190
19	М   М	19	Формалин   Formalin	240	200
20	–	19,5	Формалин   Formalin	210	220
21	Ж   F	19,5	Формалин   Formalin	316	230
22	Ж   F	20,5	Формалин   Formalin	320	220
23	М   М	21	Формалин   Formalin	–	–
24	М   М	21	Формалин   Formalin	300	240
25	М   М	21,5	Формалин   Formalin	–	250
26	М   М	21,5	Формалин   Formalin	–	–
27	М   М	21,5	Формалин   Formalin	440	260
28	–	21,5	Формалин   Formalin	465	270
29	Ж   F	24	Формалин   Formalin	450	200
30	М   М	24	Формалин   Formalin	550	272
31	Ж   F	26	Жидкость Буэна   Bouin solution	730	310
32	М   М	29,5	Формалин   Formalin	1620	390
33	М   М	30,5	Формалин   Formalin	1800	390
34	М   М	34,5	Жидкость Буэна   Bouin solution	3670	510
35	М   М	38	Формалин   Formalin	2720	490
36	Ж   F	38	Формалин   Formalin	3100	500
37	Ж   F	40	Формалин   Formalin	2760	530
38	Ж   F	4 года 9 месяцев   4 years 9 months	Формалин   Formalin	–	–

КТР – копчиково-теменная длина: для плодов на преемфетальном этапе развития указаны значения КТР (№ 1–8), в раннем фетальном развитии – значения КТР и длины тела (№ 9–17), в конце раннего фетального периода и позже (№ 18–37) – длина тела; \* – возраст плодов приводится в гестационных неделях (gw – gestational weeks), для плодов на ранних сроках развития дополнительно указан срок в неделях после оплодотворения (pcw – postconceptional weeks); в сравнительных целях был использован аутопсийный материал от ребенка в возрасте 4 лет 9 месяцев (№ 38)

CRL – crown-rump length: for pre-fetal fetuses (No. 1–8) CRL values are provided; for early fetuses (No. 9–17) both CRL and body length are provided; for the fetuses at the end of early fetal period and older (No. 18–37) body length is provided;

\* – ages are provided: as gestational weeks (gw) for fetuses; as postconceptional weeks (pcw) for fetuses at early stages of development; brain autopsy from the child (No. 38) was used for comparison

Материалом для исследования послужили половины полушария переднего мозга от плодов без патологии нервной системы. Гестационный возраст определяли на основе патологоанатомических протоколов и истории болезни (данные ультразвуковых исследований, акушерский срок) с контролем по весовым и размерным (копчиково-теменная длина, длина тела, длина стопы) характеристикам плода. Для периодизации внутриутробного этапа онтогенеза использована классификация А.П. Милованова и С.В. Савельева [24]: префетальный период (8 недель после оплодотворения – 12 недель гестации), ранний фетальный период (13–20 недель гестации), средний фетальный период (21–28 недель гестации) и поздний фетальный период (29–40 недель гестации). Фиксация материала осуществлялась в 10% забуференном формалине (фосфатный буфер, pH 7,2–7,4) либо в жидкости Буэна (хранение в 70% спирте). Для исследования брали полушарие головного мозга. Изготавливались серийные парафиновые срезы (10 мкм). Проводилось рутинное гистологическое окрашивание (крезил-фиолет по Нисслю, по Маллори). Всего таким образом мы обработали материал от 37 аутопсий на разных сроках гестации (аутопсию мозга ребенка в возрасте 4 лет 9 месяцев использовали для сравнения).

Серию иммуногистохимических исследований проводили согласно отработанному протоколу [25] с температурным демаскированием антигенов в цитратном буфере (pH 5,9–6,0). Для визуализации иммунопероксидазных реакций использовали систему Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии со спецификацией. В качестве антител первого этапа использовались растворы анти-GFAP (1:100–1:200, моноклональные мышинные, Neomarkers (LabVision, Thermo Fisher Scientific, США), анти-GFAP (1:1000, моноклональные кроличьи, Biotium, США), anti-ALDH1L1 (1:2000, поликлональные кроличьи, Sigma-Aldrich, США), anti-FABP7 (1:2000, моноклональные мышинные, Sigma-Aldrich, США) в 0,01 М фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS, pH 7,3–7,5, «Биолот», Россия). Для каждого опыта ставили негативный контроль. Срезы анализировали с помощью светового микроскопа (DM 2500, Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой камерой (программное обеспечение mcgA-View 7.1.1.2, «Ломо», Россия). Распределение иммунопероксидазной метки оценивали в крупных корковых и подкорковых структурах переднего мозга на срезах целого полушария на уровне обонятельных луковиц и обонятельного бугорка, на уровне передней комиссуры (кзади от обонятельного бугорка), на уровне гиппокампа. Распределение метки описывали отдельно для крупных корковых регионов – новой коры (neocortex), старой коры (archaecortex) и древней коры (paleocortex), а также переходной островковой (cortex insularis) и энторинальной коры (cortex entorhinalis) и подкорковых ядер (nucleus caudatus, putamen, n. accumbens, globus

pallidus); также отдельно оценивали распределение маркера в составе временных (транзиторных или провизорных) структур развивающегося переднего мозга – транзиторные зоны стенки полушария (вентрикулярная, субвентрикулярные внешняя и внутренняя зоны, интермедиальная зона и подпластинка), латеральная дуга миграции вдоль развивающейся ограды (claustrum), включая пролиферативные зоны переднего мозга – вентрикулярная зона (zona ventricularis) стенки полушария и желудочков обонятельной луковицы, желудочковые возвышения (eminentia ventricularis).

## Результаты

### *Профиль распределения GFAP<sup>+</sup> структур в переднем мозге плодов человека*

Иммунопозитивные с антителами к GFAP (GFAP<sup>+</sup>) клетки и волокна впервые появляются в пределах переднего мозга медиально, в области серого покрова (indusium griseum), свода (fornix) мозга уже в начале раннего фетального периода (13–14 недель гестации). Показано, что астроглия медиальной области переднего мозга (глия indusium griseum, глиальный клин внутренней надмозолистой области, так называемая запирающая глия, расположенная в будущей подмозолистой области) необходима для нормального морфогенеза мозолистого тела [27], начало закладки которого относится к концу префетального периода [28]. Выявление GFAP-антигена в медиальной области полушария, включающей границу закладки археокортекса, является наиболее ранним в пределах переднего мозга и отмечается уже на 16-й гестационной неделе в большинстве опубликованных исследований [16] и даже раньше – на рубеже префетального и раннего фетального периодов [18].

Кроме того, GFAP<sup>+</sup> клетки и волокна в начале–середине раннего фетального периода (15–16 недель гестации) регистрируются в пролиферативных областях дорсальной и вентральной закладок старой коры, свода конечного мозга и септальной зоны пролиферации (интерпедункулярная область), в области базальных ядер переднего мозга, вентральной области латерального пути миграции – по внешней дуге развивающейся ограды (развивающейся наружной капсулы) и субпиальном гранулярном слое маргинальной зоны на границах палеокортикальной области и переходной островковой коры, а также на стыке зон Pr1–Pr2 под нижним краем латеральной дуги миграции (рис. 1), что соответствует полученным ранее результатам по развитию первичной обонятельной коры мозга человека в раннем плодовом периоде (16–21 неделя гестации) [25].

С увеличением срока развития GFAP<sup>+</sup> зоны расширяются от обозначенных первичных областей. На 16 неделях гестационного развития небольшое количество GFAP<sup>+</sup> клеток наблюдается вентрально в области ядер полосатого тела и латерального желудочкового возвышения. Как показано нами ранее, на 17–18-й неделе вся краевая зона маргинального слоя древней

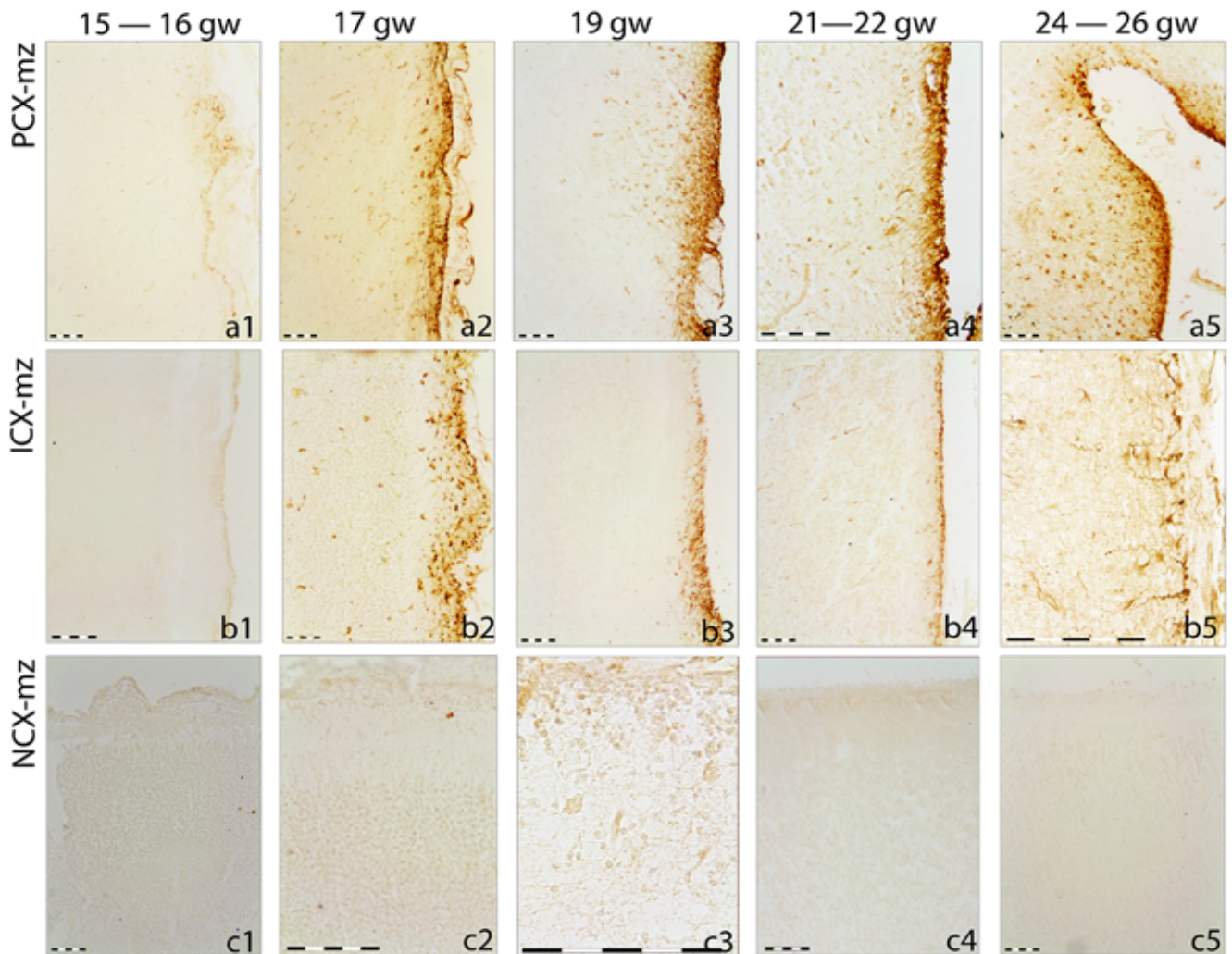


Рис. 1. GFAP<sup>+</sup> клетки и волокна маргинальной зоны (mz) различных областей коры переднего мозга плодов человека, метка – 100 мкм.

GFAP<sup>+</sup> в маргинальной зоне древней коры (PCX) (a1-5); маргинальная зона островковой коры (ICX) в области поля  $ii_0$  (b2), иммунореактивность краевой зоны островковой коры при переходе от области полей перипалеокортикального происхождения к неокортикальным закладкам (b3), маргинальная зона островковой коры в области верхних полей палеокортикального происхождения (b4) и в переходной области (b5); маргинальная зона неокортекса (NCX) остается иммунонегативной вплоть до позднего фетального периода (c1-5): ICX – островковая кора (insula), mz – маргинальная (краевая) зона (zona marginalis, lamina marginalis), NCX – новая кора (неокортекс) (neocortex), PCX – древняя кора (палеокортекс) (paleocortex)

Fig. 1. GFAP-immunoreactivity of the marginal zone (mz) in different cortical areas of human fetuses, scale bar – 100  $\mu$ m. GFAP-immunoreactivity in the paleocortical (PCX) marginal zone (a1-5); marginal zone of the insular cortex (ICX) of the  $ii_0$  area (b2), GFAP-immunoreactivity of the ICX marginal zone between the presumptive areas of peripaleocortical and neocortical origin (b3), marginal zone of the ICX of the upper insular areas of peripaleocortical origin (b4) and transitional area (b5); marginal zone of the neocortex (NCX) remains immunonegative until late fetal period (c1-5): ICX – insular cortex, mz – marginal zone (zona marginalis, lamina marginalis), NCX neocortex, PCX – paleocortex

препириформной коры демонстрирует GFAP<sup>+</sup> клетки и волокна, II и III палеокортикальные слои также содержат единичные GFAP<sup>+</sup> структуры [25]. GFAP<sup>+</sup> структуры в островковой коре на этих сроках не обнаружены.

С увеличением срока развития GFAP<sup>+</sup> зоны продолжают расширяться: в зоне дорсальной закладки старой коры по направлению вверх в области вентрикулярной зоны с последующим вовлечением субвентрикулярных подзон; в области латерального пути миграции и ба-

зальных ядер дорсально. К середине раннего фетального периода GFAP<sup>+</sup> структуры стабильно выявляются в вентрикулярной зоне переднего мозга, также GFAP<sup>+</sup> астроциты появляются в субвентрикулярной зоне (как внешней, так и внутренней). Интермедиальная зона полушарий переднего мозга и подпластинка (подкорковая область) демонстрируют немногочисленные GFAP<sup>+</sup> волокна, но не астроциты, оставаясь практически иммунонегативными с антителами к GFAP (рис. 2).

К середине раннего фетального периода единичные GFAP<sup>+</sup> клетки и волокна появляются в маргинальной зоне островковой коры. Наиболее многочисленны GFAP<sup>+</sup> структуры в области переходного  $ii_0$  поля, непосредственно граничащего с палеокортикальной пластинкой и каудальнее с височным отделом новой коры, их количество сокращается по направлению вверх – к островковым полям неокортикального происхождения и сходит на нет в зоне новой коры, не входящей в островок. Маргинальная зона островковой коры содержит меньше GFAP<sup>+</sup> по сравнению с препириформной зоной в конце раннего фетального периода (рис. 1). GFAP-иммунореактивные элементы выявляются во II и III сло-

ях развивающейся палеокортикальной пластинки, тогда как корковая пластинка островковой коры не содержит GFAP<sup>+</sup> астроциты на этом этапе гестации. Эта разница сохраняется и на более поздних сроках внутриутробного развития – в конце раннего фетального периода и в среднем фетальном периоде. Корковая пластинка новой коры остается GFAP-иммунонегативной (GFAP<sup>-</sup>) на этих сроках и позже – в среднем и позднем фетальном периодах развития.

GFAP<sup>+</sup> элементы четко выявляются в области латерального желудочкового возвышения (ганглиозного бугорка) в середине раннего фетального периода. В желудочковой зоне медиального возвышения GFAP<sup>+</sup>

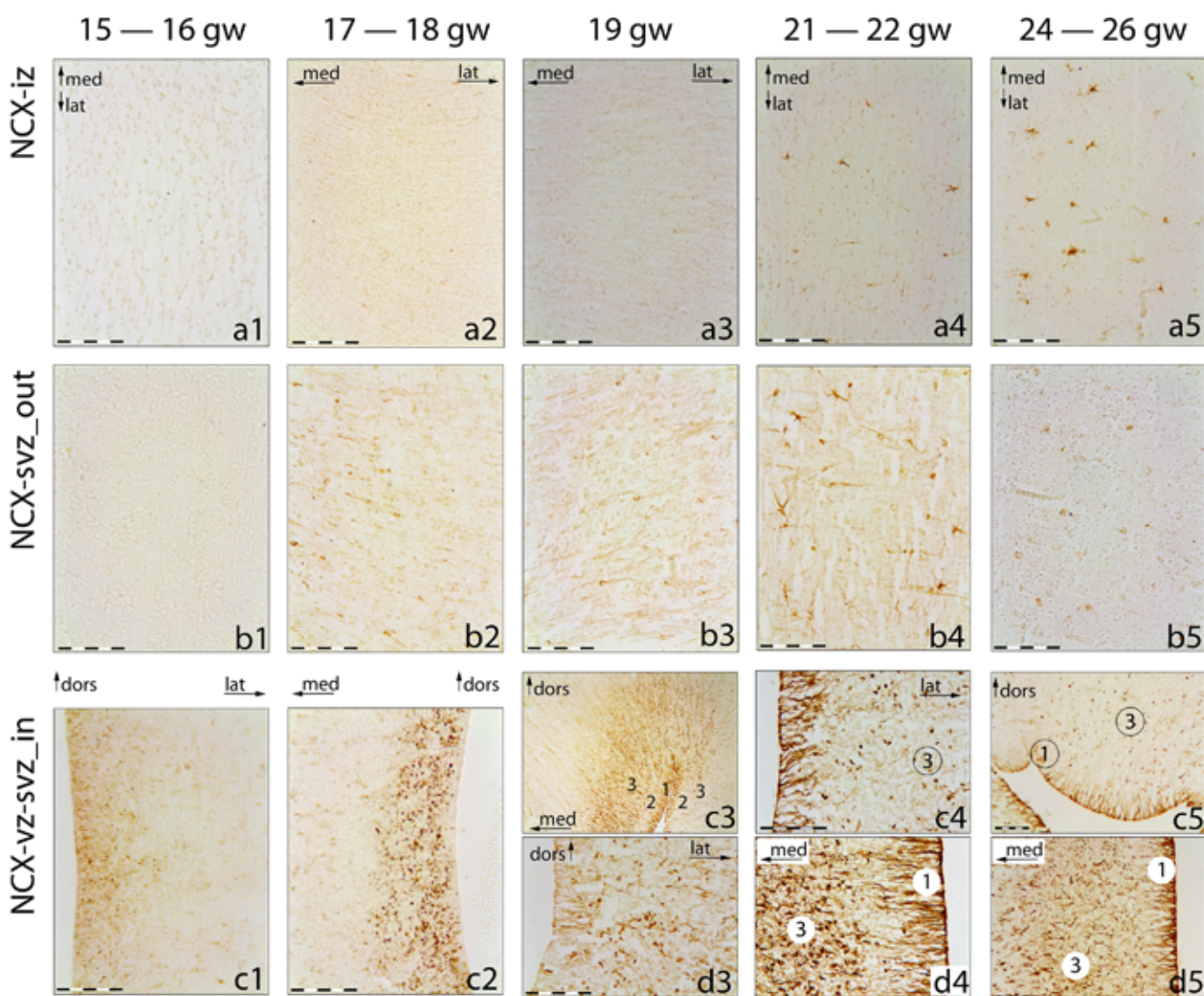


Рис. 2. Распределение GFAP<sup>+</sup> в транзиторных зонах стенки полушарий, метка – 100 мкм.

1 – вентрикулярная зона, 2 – внутренняя субвентрикулярная зона, 3 – наружная субвентрикулярная зона, iz – межзучная (интермедиальная) зона (zona intermedia), NCX – новая кора (неокортекс) (neocortex), sp – подпластинка (zona sublamina), svz – прижелудочковая (субвентрикулярная) зона (zona subventricularis), vz – желудочковая зона (вентрикулярный слой) (zona ventricularis, matrix germinalis)

Fig. 2. GFAP-immunoreactivity distribution of the transitional zones of the hemisphaeria wall, scale bar – 100  $\mu$ m.

1 – ventricular zone, 2 – inner subventricular zone, 3 – outer subventricular zone, iz – intermediate zone (zona intermedia), NCX – neocortex, sp – subplate (zona sublamina), svz – subventricular zone (zona subventricularis), vz – ventricular zone (zona ventricularis, matrix germinalis)



структур меньше, чем в области латерального бугра. Базальные области переднего мозга – зона перегордки, передняя комиссура и зона дорсальнее передней комиссуры, включая ядро терминальной полоски, диагональная связка и безымянная субстанция – демонстрируют GFAP<sup>+</sup> астробласты. GFAP<sup>+</sup> волокна и единичные астробласты обнаружены в структурах полосатого тела, причем вентральные ядра (бледный шар) содержат больше GFAP<sup>+</sup> астробластов по сравнению с неостриатумом – хвостатым ядром и скорлупой.

К концу раннего фетального периода, на 19-й неделе гестационного развития, вентрикулярная и субвентрикулярные зоны стенки полушария, а также интермедиальная зона демонстрируют GFAP<sup>+</sup> структуры. К началу среднего фетального периода (20–21 неделя гестации) все провизорные (транзиторные) зоны стенки полушария, включая зону тангенциальной миграции (рис. 2), имеют GFAP<sup>+</sup> астробласты. При этом медиальная и дорсальная области вентрикулярной и внутренней субвентрикулярной зон неокортекса содержат больше GFAP<sup>+</sup> элементов, чем латеральный участок коры (рис. 2), а зона тангенциальной миграции больше, чем прилежащая внешняя часть интермедиальной зоны и субпластинка, причем разница в распределении GFAP<sup>+</sup> клеток между медиальной/дорсальной и латеральной областями коры тоже сохраняется. Паттерн распределения GFAP<sup>+</sup> структур в маргинальной зоне островковой коры не изменяется – от вентральных областей перипалеокортикального происхождения количество GFAP<sup>+</sup> элементов снижается по направлению к неокортикальной области островка.

В среднем фетальном периоде GFAP<sup>+</sup> волокна и клетки также выявляются на всем протяжении латеральной дуги миграции, в области полосатого тела, внутренней капсулы, базальных ядер переднего мозга. Общие закономерности GFAP<sup>+</sup> распределения в провизорных пролиферативных и интермедиальной зонах коры сохраняются с преобладанием GFAP<sup>+</sup> структур в медиальной области стенки полушарий, количество GFAP<sup>+</sup> астробластов в подпластинке нарастает. Маргинальная зона новой коры начинает демонстрировать GFAP<sup>+</sup> элементы только в позднем фетальном периоде, корковая пластинка остается в основном иммунонегативной (рис. 1).

#### *Профиль распределения ALDH1L1<sup>+</sup> структур в переднем мозге плодов человека*

ALDH1L1<sup>+</sup> клетки и волокна в пределах переднего мозга плодов человека выявляются уже на 13–14-й неделях гестации, в самом начале раннего фетального периода. ALDH1L1<sup>+</sup> астробласты обнаружены в следующих структурах: базальный передний мозг (диагональная связка и безымянная субстанция), вентральная область стриатума (бледный шар, вентральная область скорлупы), вся область латеральной дуги миграции, древняя кора. Единичные иммунореактивные клетки найдены в вентрикулярной области желудочковых возвышений (ганглиозных бугров) и единичные ALDH1L1<sup>+</sup>

элементы в глубине бугра. С увеличением срока развития ALDH1L1<sup>+</sup> клетки регистрируются по всей зоне латерального желудочкового возвышения, по всей области ядер полосатого тела, включая область миндаины.

Распространение ALDH1L1<sup>+</sup> элементов в плащевых структурах переднего мозга начинается во второй половине раннего плодного периода (16 недель гестации) с вентрикулярной и субвентрикулярной зон переднего мозга, которые демонстрируют в основном ALDH1L1<sup>+</sup> волокна, но не ALDH1L1<sup>+</sup> клетки астроцитарной цитоморфологии. Интермедиальная зона полушарий содержит редкие ALDH1L1<sup>+</sup> клетки, подпластинка остается иммунонегативной с антителами к ALDH1L1 (ALDH1L1<sup>-</sup>). К 17–18 неделям гестации вентральная область островковой коры включает отдельные ALDH1L1<sup>+</sup> астробласты, причем как в маргинальной зоне, так и в зоне корковой пластинки переходного перипалеокортикального происхождения. Неокортикальная корковая пластинка остается ALDH1L1<sup>-</sup> до 19 гестационных недель. На 19-й неделе гестации ALDH1L1<sup>+</sup> клетки выявляются уже не только в корковом слое островковой коры – единичные ALDH1L1<sup>+</sup> астробласты видны в области новой коры, включая корковую пластинку и подпластинку (рис. 3). К концу раннего фетального – началу среднего фетального периода (21–22 недели гестации) многочисленные ALDH1L1<sup>+</sup> астробласты обнаруживаются в вентрикулярной, субвентрикулярных и интермедиальной провизорных зонах, включая зону тангенциальной миграции. Подпластинка и собственно корковая пластинка демонстрируют меньше ALDH1L1<sup>+</sup> структур на этом этапе развития. С увеличением срока гестации в среднем и позднем фетальном периоде количество ALDH1L1<sup>+</sup> клеток и волокон в пределах неокортикальной пластинки увеличивается. ALDH1L1<sup>+</sup> структуры в вентрикулярной, субвентрикулярных, интермедиальной зонах коры, а также вентральных пролиферативных зонах переднего мозга (ганглиозные возвышения) выявляются в среднем и позднем фетальных периодах.

#### *Профиль распределения FABP-7<sup>+</sup> структур в переднем мозге плодов человека*

FABP-7<sup>+</sup> нейробласты впервые регистрируются в переднем мозге плодов человека уже на префетальном этапе внутриутробного развития в ограниченной области дорсолатеральной поверхностной зоны латерального желудочкового возвышения (ганглиозного бугра) и прилегающих вентрикулярной и субвентрикулярной зон новой коры, в обонятельных луковицах, септальной желудочковой зоне (интерпедункулярная зона пролиферации). Отдельные FABP-7-иммунореактивные нейробласты обнаруживаются также в области полосатого тела (скорлупа). FABP-7<sup>+</sup> волокна, но не клетки располагаются вентрально в субвентрикулярных областях новой коры, вдоль латерального пути миграции, в области островковой коры и внутренней капсулы. На 14-й неделе гестационного развития FABP-7<sup>+</sup>

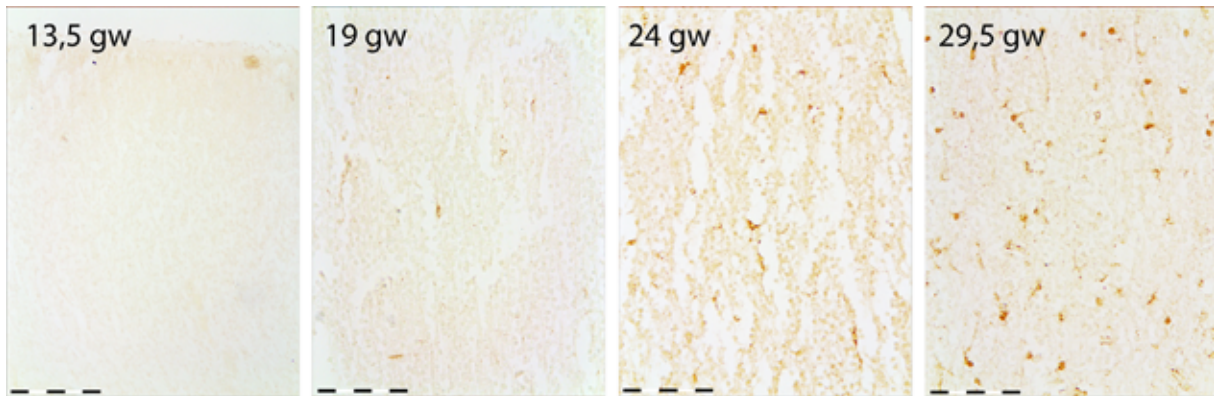


Рис. 3. ALDH1L1<sup>+</sup> в корковой пластинке (lamina corticalis) развивающейся новой коры на разных сроках гестации, метка – 100 мкм  
 Fig. 3. ALDH1L1-immunoreactivity in the cortical plate (lamina corticalis) of human fetuses at different prenatal stages, scale bar – 100 μm

структуры наблюдаются на всем протяжении субвентрикулярной зоны новой коры. FABP-7<sup>+</sup> нейробласты также на этом сроке обнаружены в вентрикулярной области медиального желудочкового возвышения (ганглиозного бугра). Отдельные FABP-7<sup>+</sup> клетки находятся в области базальных ядер переднего мозга (диагональной связки и безымянной субстанции), ядер полосатого тела (хвостатого ядра и скорлупы), палеокортикальной коры. На 15–16-й неделе гестации FABP-7<sup>+</sup> клеток в области желудочковой зоны у плодов человека

практически не обнаружено, субвентрикулярная зона содержит немногочисленные FABP-7 иммунореактивные клетки. Наряду с этим FABP-7 нейробласты выявляются в глубоких областях (субвентрикулярная и мантийная области), но не в пределах желудочкового поверхностного слоя латерального ганглиозного бугра. Желудочковый слой медиального ганглиозного бугра, напротив, демонстрирует FABP-7<sup>+</sup> клетки на этом этапе гестации (рис. 4). В области тангенциальной миграции новой коры, но не в прилегающей интермедиальной

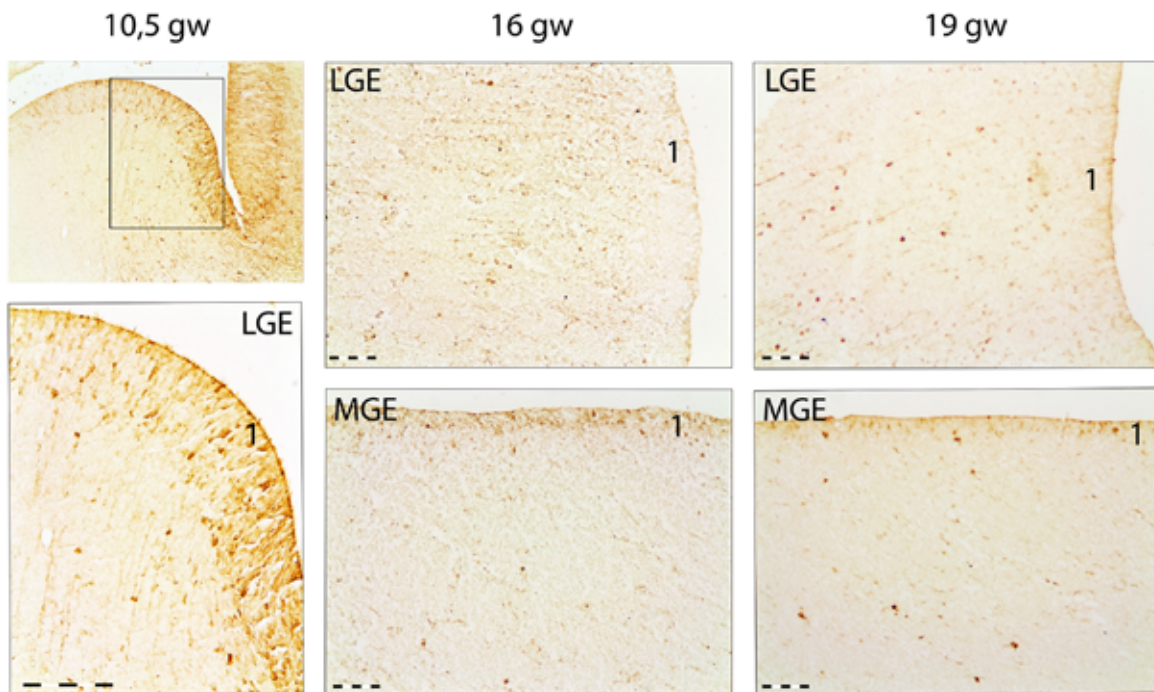


Рис. 4. Изменение распределения FABP-7<sup>+</sup> в вентральных зонах пролиферации переднего мозга на префетальном и в раннем фетальном периодах, метка – 100 мкм.

1 – вентрикулярная зона желудочковых возвышений, LGE – латеральное желудочковое возвышение (ганглиозный бугор) (eminentia ventricularis medialis), MGE – медиальное желудочковое возвышение (ганглиозный бугор) (eminentia ventricularis medialis)

Fig. 4. FABP-7-immunoreactivity distribution changes in the ventral proliferative zone of telencephalon at the prenatal and fetal periods, scale bar – 100 μm .

1 – ventricular zone, LGE – lateral ventricular eminence (eminentia ventricularis medialis), MGE – medial ventricular eminence (eminentia ventricularis medialis)

зоне также обнаруживаются FABP-7<sup>+</sup> нейробласты. Такое перераспределение паттерна иммунореактивности в пределах пролиферативных зон переднего мозга косвенно свидетельствует об участии FABP-7 в ранней пролиферации/миграции нейробластов из соответствующих герминативных зон. FABP-7<sup>+</sup> нейробласты также регистрируются в большом количестве в области ядер полосатого тела, включая миндалевидный комплекс. К 16-й неделе гестации отдельные FABP-7 клетки обнаружены в пределах палеокортикальной пластинки, в основном на границе второго пирамидного слоя и глубокого третьего слоя полиморфных клеток. К 19-й неделе развития FABP-7<sup>+</sup> клетки появляются в области перехода к дорсальной закладке архекортекса. Вентрикулярная зона коры содержит единичные FABP-7<sup>+</sup> волокна и клетки, с увеличением срока гестации их количество также возрастает. В пределах вентрикулярной зоны медиального желудочкового возвышения в конце раннего плодного периода развития обнаружены отдельные FABP-7<sup>+</sup> клетки. Область развивающейся ограды кнаружи от латеральной дуги миграции остается иммунонегативной с антителами к FABP-7 (FABP-7<sup>-</sup>). Такая картина распределения иммунореактивности сохраняется вплоть до конца раннего фетального периода (20-я неделя гестации). Только в среднем фетальном периоде FABP-7<sup>+</sup> нейробласты обнаруживаются в области корковой пластинки новой, островковой и энторинальной коры. Область тангенциальной миграции содержит FABP-7<sup>+</sup> клетки в среднем фетальном периоде, прилежащая внешняя часть интермедиальной зоны и подпластинка остаются FABP-7<sup>-</sup>, в то время как в области ганглиозных возвышений отдельные FABP-7<sup>+</sup> нейробласты наблюдаются лишь в глубоких зонах, на границе с хвостатым ядром.

В позднем фетальном периоде FABP-7<sup>+</sup> клетки многочисленны в пределах древней, островковой, энторинальной и новой коры.

### Обсуждение

Согласно нашим данным, GFAP<sup>+</sup> волокна и клетки появляются в развивающемся переднем мозге человека к началу раннего фетального периода. Начало и середина раннего фетального периода являются ключевой стадией для экспрессии GFAP в переднем мозге плодов человека. Белковый продукт экспрессии GFAP характерен для астроцитов на поздних этапах клеточной дифференцировки, что косвенно свидетельствует о том, что старт астроцитарной дифференцировки относится к более ранним срокам гестации – самому началу раннего фетального периода (13–14 недель гестации) и/или ранее. Ранняя регистрация GFAP<sup>+</sup> астроглии в ключевых зонах переднего мозга свидетельствует о направляющей роли астроцитов в процессе созревания структур переднего мозга. Другие точки ранней локализации GFAP<sup>+</sup> структур также могут являться реперными для

общего морфогенеза и требуют дальнейших исследований для уточнения их морфогенетической активности.

Исследование древней обонятельной коры у плодов человека в раннем фетальном периоде онтогенеза с антителами к GFAP показали опережающее развитие палеокортекса по сравнению с эволюционно более новыми структурами плаща, ведущую экспрессию GFAP в краевой (маргинальной) зоне по сравнению с палеокортикальной пластинкой [26]. Дальнейшие исследования подтвердили опережающую астроцитарную дифференцировку по GFAP в пределах палеокортекса по сравнению с островковой и новой корой и на более поздних этапах внутриутробного онтогенеза. Островковая кора демонстрирует более раннюю дифференцировку по сравнению с новой корой, по направлению от переходных периопалеокортикальных зон дорсально к будущим 14-му и 13-му полям островка неокортикального происхождения. Опережающая астроцитарная дифференцировка островковой коры по сравнению с новой также сохраняется на всех сроках внутриутробного онтогенеза, в среднем и позднем фетальных периодах, до рождения. Более ранняя дифференцировка GFAP<sup>+</sup> структур в маргинальной зоне по сравнению с таковой в корковой пластинке и провизорных зонах коры показана в пределах всех корковых территорий. Кроме того, в переднем мозге плодов человека в позднем фетальном периоде развития так же, как и у взрослых людей, GFAP<sup>+</sup> структуры обнаружены в основном в астроцитах формирующегося белого вещества.

Приведенный здесь профиль трансляции переднего мозга по GFAP соответствует данным транскрипционных карт, полученным методом гибридизации *in situ*, у плодов человека на сроках 15 и 21 недель после оплодотворения, представленным группой Института Аллена <<http://www.brainspan.org/ish/gene/show/2654>>.

Временная динамика распределения иммунопозитивных с антителами к ALDH1L1 (ALDH1L1<sup>+</sup>) клеток в переднем мозге отличается от трансляционного профиля по GFAP-антигену (рис. 5). ALDH1L1-иммунореактивность выявляется уже на 13–14 неделях гестации, то есть раньше, чем с анти-GFAP. Исходя из сроков регистрации ALDH1L1<sup>+</sup> астроцитов в переднем мозге плодов человека уже в начале раннего фетального периода, можно предположить, что созревание и дифференцировка астроцитарной популяции стартует не позднее 13–14 недель гестации.

Динамика распределение ALDH1L1<sup>+</sup> структур в переднем мозге плодов человека на разных сроках развития отражает экспансию когорты ALDH1L1<sup>+</sup> астроцитов от вентральных зон переднего мозга, включая палеокортекс, к дорсальным подкорковым и плащевым структурам.

Островковая и новая кора демонстрируют ALDH1L1<sup>+</sup> клетки и волокна на более ранних сроках, чем GFAP<sup>+</sup> элементы. Трансляционный профиль в области новой коры для GFAP и ALDH1L1 антигенов на исследованных сроках совпадает только

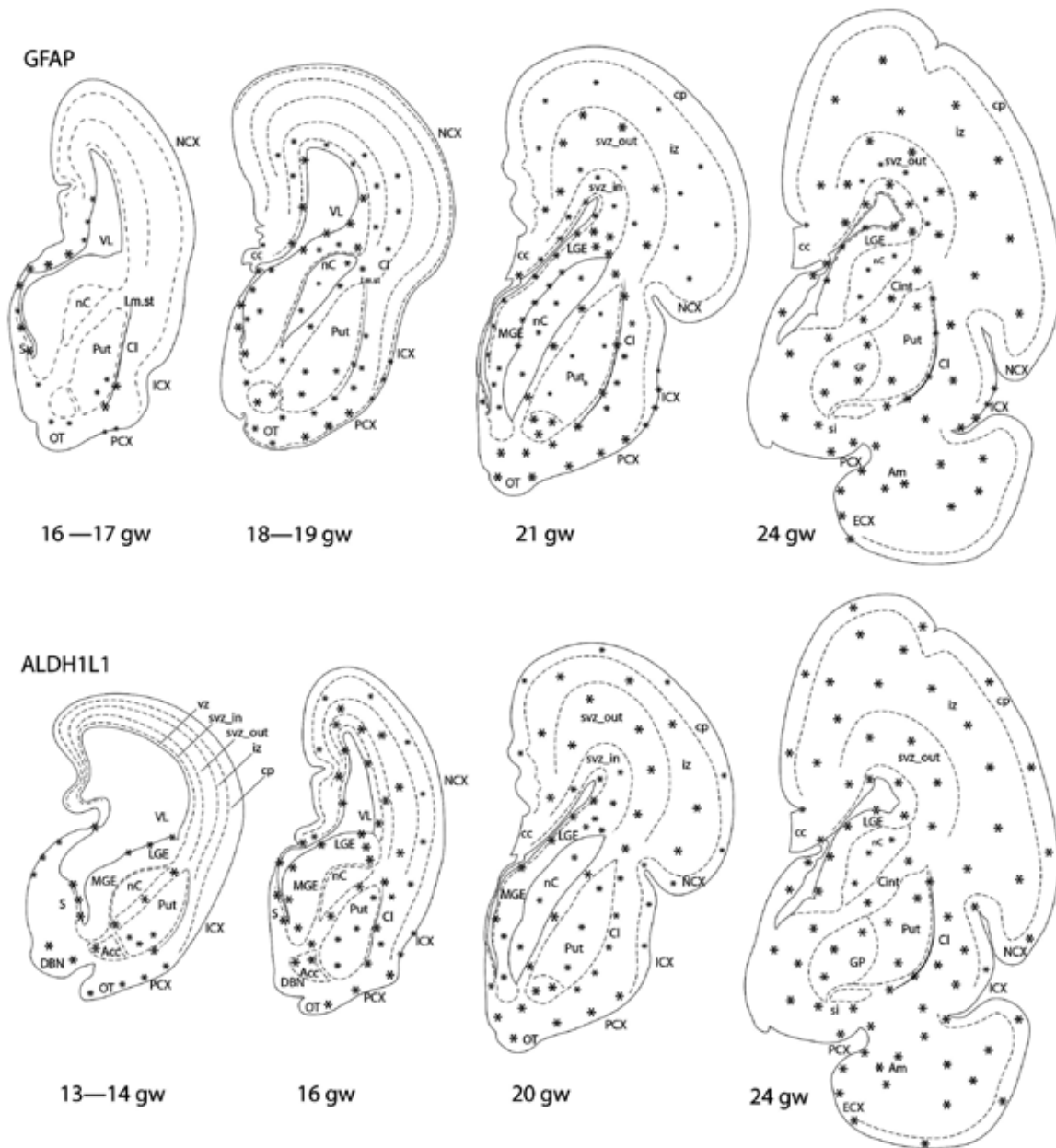


Рис. 5. Общие схемы распределения GFAP и ALDH1L1 метки в переднем мозге плодов человека на разных этапах плодного развития: звездочкой (\*) помечены структуры, демонстрирующие иммунореактивные элементы.

Асс – прилежащее ядро (nucleus accumbens), Ам – миндалина (amygdala), сс – мозолистое тело (corpus callosum), CI – ограда (claustrum), ср – корковая пластинка (cortical plate) (подпластинка и маргинальная зоны не обозначены на схемах), DBN – ядро диагональной связки (diagonal band nuclei), ECG – энторинальная кора (cortex entorhinalis), GP – бледный шар (globus pallidus), ICX – островковая кора (insula), nC – хвостатое ядро (nucleus caudatus), NCX – новая кора (неокортекс) (neocortex), iz – междуточная (интермедиальная) зона (zona intermedia), lat. migr. st. – латеральная дуга миграции, LGE – латеральное желудочковое возвышение (ганглиозный бугор) (eminentia ventricularis medialis), MGE – медиальное желудочковое возвышение (ганглиозный бугор) (eminentia ventricularis medialis), PCX – древняя кора (палеокортекс) (paleocortex), Put – скорлупа (putamen), svz\_out – наружная субвентрикулярная зона, svz\_in – внутренняя субвентрикулярная зона, vz – вентрикулярная зона (zona ventricularis), S – перегородка (septum), si – безымянная субстанция (substantia innominata)

Fig. 5. Schemes of GFAP- и ALDH1L1-immunoreactivity distribution in the human fetal telencephalon at different stages:

\* – marked immunoreactivity structures.

Acc – nucleus accumbens, Am – amygdala, cc – corpus callosum, CI – claustrum, cp – cortical plate, DBN – diagonal band nuclei, ECG – entorhinal cortex, GP – globus pallidus, ICX – insula, nC – nucleus caudatus, NCX – neocortex, iz – zona intermedia, lat. migr. st. – lateral migratory stria, LGE – eminentia ventricularis medialis, MGE – eminentia ventricularis medialis, PCX – paleocortex, Put – putamen, svz\_out – outer subventricular zone, svz\_in – inner subventricular zone, vz – zona ventricularis, S – septum, si – substantia innominate

для провизорных зон с небольшим опережением трансляции ALDH1L1 по вентрикулярной, субвентрикулярной, интермедиальной зонам коры. Кортикальная пластинка остается GFAP<sup>-</sup> вплоть до поздних сроков гестации, тогда как ALDH1L1<sup>+</sup> структуры кортикальная пластинка неокортекса демонстрирует уже к концу раннего фетального периода. Вовлечение кортикальной пластинки новой коры в астроцитарную дифференцировку, выявленную с использованием антител к ALDH1L1, уже в конце раннего фетального – начале среднего фетального периодов и отсутствие на этих сроках гестации GFAP<sup>+</sup> структур в пределах кортикальной пластинки новой коры может отвечать данным о большей универсальности ALDH1L1 как панастроцитарного маркера в отношении кортикальной пластинки мозга плодов человека, отмеченной для взрослых млекопитающих, но не для провизорных зон коры. Кроме того, распределение GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> клеток и волокон включает герминативную вентрикулярную и вышележащие провизорные зоны новой коры в среднем фетальном периоде, что не исключает желудочковое происхождение волокнистых астроцитов коры [14]. Результаты иммуноморфологического исследования коры переднего мозга с антителами к GFAP и ALDH1L1 также свидетельствуют об активном глиогенезе в коре плодов человека на более ранних сроках, чем описано для EGFR<sup>+</sup> (рецептор эпидермального фактора роста) сцепленного глиогенеза [29].

Распределение FABP-7<sup>+</sup> нейробластов в пределах переднего мозга человека на разных сроках гестации не совпадает с трансляционными профилями по GFAP и ALDH1L1-антигенам, что ставит под сомнение принадлежность FABP-7<sup>+</sup> клеток к астроцитарной популяции на этапе внутриутробного онтогенеза. Вопрос о принадлежности FABP-7<sup>+</sup> клеток исключительно к астроцитарной субпопуляции требует дальнейшего сравнительного исследования с применением методов двойного и тройного иммунофлуоресцентного мечения, а также с нейрональными маркерами, маркерами олигодендроглии.

Кроме того, наши результаты распределения FABP-7<sup>+</sup> в развивающемся мозге человека отличаются от опубликованных данных, полученных на модельных видах. Раннее распределение FABP-7 иммунореактивности связано с нейроэпителиальными и радиальными клетками вентрикулярной и субвентрикулярной зон у млекопитающих [30–31]. Вентрикулярная зона плодов человека в середине раннего фетального периода не содержала FABP-иммунореактивных элементов. Перераспределение иммунореактивности в зависимости от срока гестации в пролиферативных зонах переднего мозга также описано впервые и может свидетельствовать об участии FABP-7 в механизмах созревания и миграции одной из когорт клеток вентрального происхождения. Локализация FABP-7<sup>+</sup> нейробластов в среднем фетальном периоде в зоне тангенциальной миграции переднего мозга, но не в прилегающей интер-

медиальной зоне и зоне субластинки в раннем и среднем фетальных периодах косвенно свидетельствует об участии антигена в созревании популяции клеток коры вентрального происхождения, мигрирующих тангенциально, но не дорсального происхождения, мигрирующих радиально.

### Заключение

Общие данные сравнительного иммуноморфологического исследования мозга плодов человека на ранних стадиях внутриутробного развития с антителами к GFAP, ALDH1L1, FABP-7 показали, что динамика распределения маркеров в развивающемся переднем мозге человека отличается, что свидетельствует о гетерогенности астроцитарной популяции уже в раннем онтогенезе человека.

Локализация распределения GFAP<sup>+</sup> структур в раннем плодном развитии включает морфогенетически активные зоны переднего мозга. Динамика распространения GFAP<sup>+</sup> волокон и клеток в переднем мозге плодов человека свидетельствует о наличии стартовых зон GFAP-экспансии на ранних сроках гестации.

Распределение GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> астробластов в переднем мозге плодов человека на разных стадиях гестации отражает некоторое опережение распространения ALDH1L1-метки по провизорным зонам переднего мозга. Полученные данные поддерживают более универсальный характер ALDH1L1-антигена как панастроцитарного маркера для кортикальной пластинки, однако не для провизорных зон коры. Вопрос о полной гомологичности GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> астроцитарных популяций подкорковых и провизорных корковых структур переднего мозга на пренатальном этапе онтогенеза остается открытым, что требует дальнейших исследований с использованием двойного иммунофлуоресцентного мечения.

Сроки регистрации GFAP<sup>+</sup> и ALDH1L1<sup>+</sup> структур в переднем мозге плодов человека косвенно свидетельствуют, что созревание и дифференцировка астроцитарной популяции переднего мозга человека стартует не позднее начала раннего фетального периода (13 недель гестации). Распределение GFAP и ALDH1L1 глиобластов в провизорных зонах стенок полушарий, включая вентрикулярную и субвентрикулярные зоны, интермедиальную зону, не исключает происхождение волокнистых астроцитов из дорсальных пролиферативных зон переднего мозга.

Сравнительный анализ динамики распределения FABP-7<sup>+</sup> нейробластов в переднем мозге плодов человека ставит под вопрос принадлежность FABP-7<sup>+</sup> исключительно к астроцитарной популяции на внутриутробном этапе развития человека. Данные о динамике перераспределения FABP-7<sup>+</sup> нейробластов в зависимости от срока гестации в вентральных пролиферативных и других провизорных зонах переднего мозга косвенно указывают на участие FABP-7 в созревании и миграции клеток вентрального происхождения.

**Вклад авторов**

Концепция и дизайн исследования – А.С. Харламова, С.В. Савельев.  
Сбор и обработка материала – А.С. Харламова, Е.Г. Отлыга, О.С. Годовалова, О.А. Юнеман.  
Написание текста – А.С. Харламова.  
Редактирование – Е.Г. Отлыга, О.С. Годовалова, О.А. Юнеман, С.В. Савельев.

**Author contributions**

Conceived the study and designed the experiment – A.S. Kharlamova, S.V. Saveliev.  
Collected the data and performed the analysis – A.S. Kharlamova, E.G. Otylga, O.S. Godovalova, O.A. Junemann.  
Wrote the paper – A.S. Kharlamova.  
Edited the manuscript – E.G. Otylga, O.S. Godovalova, O.A. Junemann, S.V. Saveliev.

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

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

**Литература/References**

1. *Barres BA.* The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008;60(3):430–40. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.013.
2. *Zhang Y, Barres BA.* Astrocyte heterogeneity: An underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol.* 2010;20(5):588–94. DOI: 10.1016/j.conb.2010.06.005.
3. *Gallo V, Deneen B.* Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron.* 2014;83(2):283–308. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.06.010.
4. *Zuchero JB, Barres BA.* Glia in mammalian development and disease. *Development.* 2015;142(22):3805–9. DOI: 10.1242/dev.129304.
5. *Colombo E, Farina C.* Astrocytes: Key regulators of neuroinflammation. *Trends Immunol.* 2016;37(9):608–20. DOI: 10.1016/j.it.2016.06.006.
6. *Pavlou MAS, Grandbarbe L, Buckley NJ, Niclou SP, Michelucci A.* Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying astrocyte identity. *Prog Neurobiol.* 2019;174:36–52. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.007.
7. *Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD et al.* Astrocytes and disease: A neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012;26(9):891–907. DOI: 10.1101/gad.188326.112.
8. *Burda JE, Sofroniew MV.* Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 2014;81(2):229–48. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.
9. *Sloan SA, Barres BA.* Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;27:75–81. DOI: 10.1016/j.conb.2014.03.005.
10. *Westergard T, Rothstein JD.* Astrocyte diversity: Current insights and future directions. *Neurochem Res.* 2020;45(6):1298–305. DOI: 10.1007/s11064-020-02959-7.
11. *Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A et al.* Composition and organization of the SCZ: A large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex.* 2006;16 Suppl 1:i103–11. DOI: 10.1093/cercor/bhk027.
12. *Rubenstein JLR, Martinez S, Shimamura K, Puelles L.* The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science.* 1994;266(5185):578–80. DOI: 10.1126/science.7939711.
13. *Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C.* A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci.* 2013;36(10):570–8. DOI: 10.1016/j.tins.2013.06.004.
14. *Tabata H.* Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci.* 2015;9:114. DOI: 10.3389/fnins.2015.00114.
15. *Yang L, Li Z, Liu G, Li X, Yang Z.* Developmental origins of human cortical oligodendrocytes and astrocytes. *Neurosci Bull.* 2022;38(1):47–68. DOI: 10.1007/s12264-021-00759-9.
16. *Holst CB, Bröchner CB, Vitting-Seerup K, Møllgaard K.* Astroglialogenesis in human fetal brain: complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40. *J Anat.* 2019; 235(3):590–615. DOI: 10.1111/joa.12948.
17. *Huang H, He W, Tang T, Qiu M.* Immunological markers for central nervous system glia. *Neurosci Bull.* 2023;39(3):379–92. DOI: 10.1007/s12264-022-00938-2.
18. *Clavreul S, Dumas L, Loulier K.* Astrocyte development in the cerebral cortex: Complexity of their origin, genesis, and maturation. *Front Neurosci.* 2022;16:916055. DOI: 10.3389/fnins.2022.916055.
19. *Stagaard Janas M, Nowakowski RS, Terkelsen OB, Møllgård K.* Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions I. Selective appearance of S-100 protein in radial glial cells of the hippocampal fimbria in human fetuses. *Anat Embryol (Berl).* 1991;184(6):549–58. DOI: 10.1007/BF00942577.
20. *Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 2008;28(1):264–78. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
21. *Hara T, Abdulaziz Umaru B, Sharifi K, Yoshikawa T, Owada Y, Kagawa Y.* Fatty acid binding protein 7 is involved in the proliferation of reactive astrocytes, but not in cell migration and polarity. *Acta Histochem Cytochem.* 2020;53(4):73–81. DOI: 10.1267/ahc.20001.
22. *Sánchez-Font MF, Bosch-Comas A, González-Duarte R, Marfany G.* Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2769–77. DOI: 10.1093/nar/gkg396.
23. *Watanabe A, Toyota T, Owada Y, Hayashi T, Iwayama Y, Matsumata M et al.* Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLoS Biol.* 2007;5(11):e297. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050297.
24. А.П. Милованов, С.В. Савельев (ред.). Внутритрубочное развитие человека: Руководство для врачей. Москва: Группа МДВ, 2006. 384 с. Доступно по адресу: [https://rusneb.ru/catalog/000199\\_000009\\_002877603](https://rusneb.ru/catalog/000199_000009_002877603) (получено 10.01.2023). AP Milovanov, SV Saveliev (eds.). Intrauterine human development: Guide for physicians. Moscow: Gruppya MDV, 2006. 384 p. (In Russ.). Available from: [https://rusneb.ru/catalog/000199\\_000009\\_002877603](https://rusneb.ru/catalog/000199_000009_002877603) (accessed 10.01.2023).
25. Харламова А.С., Годовалова О.С. Характеристика глиогенеза в препириформной коре человека в раннем фетальном

- онтогенезе. Клиническая и экспериментальная морфология. 2018;1(25):34–41. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=32768891> (получено 10.01.2023).
- Kharlamova AS, Godovalova OS.* Characteristics of gliogenesis in prepiriform cortex in early human fetuses. *Clinical and experimental morphology.* 2018;1(25):34–41 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=32768891> (accessed 10.01.2023).
26. *Kharlamova AS, Godovalova OS, Junemann OI, Saveliev SV.* Developmental dynamics of prepiriform cortex in prenatal human ontogenesis. *J Chem Neuroanat.* 2018;92:61–70. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2018.06.002.
27. *Ren T, Anderson A, Shen WB, Huang H, Plachez C, Zhang J et al.* Imaging, anatomical, and molecular analysis of callosal formation in the developing human fetal brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288(2):191–204. DOI: 10.1002/ar.a.20282.
28. *Jovanov-Milosević N, Culjat M, Kostović I.* Growth of the human corpus callosum: Modular and laminar morphogenetic zones. *Font Neuroanat.* 2009;3:6. DOI: 10.3389/neuro.05.006.2009.
29. *Fu Y, Yang M, Yu H, Wang Y, Wu X, Yong J et al.* Heterogeneity of glial progenitor cells during the neurogenesis-to-gliogenesis switch in the developing human cerebral cortex. *Cell Rep.* 2021;34(9):108788. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108788.
30. *Feng L, Hatten ME, Heintz N.* Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron.* 1994;12(4):895–908. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90341-7.
31. *Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H.* Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat.* 1996;12(2):113–22. DOI: 10.1016/s0891-0618(96)00192-5.

### Информация об авторах

Анастасия Сергеевна Харламова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Екатерина Глебовна Отлыга – младший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ольга Сергеевна Годовалова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник клинико-диагностической лаборатории Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии.

Ольга Андреевна Юнеман – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

### Author information

Anastasia S. Kharlamova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0003-1163-4132>

Ekaterina G. Otlyga – Junior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-7943-7760>

Olga S. Godovalova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.  
<https://orcid.org/0000-0002-9285-7241>

Olga A. Junemann – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-5828-5393>;

Sergey V. Saveliev – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

## Содержание нейроглобина в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс с церебральной ишемией различной степени тяжести

*Е.И. Бонь<sup>1</sup>, Н.Е. Максимович<sup>1</sup>, О.А. Карнюшко<sup>1</sup>, В.Ф. Лазарев<sup>2</sup>,  
С.М. Зиматкин<sup>1</sup>, М.А. Носович<sup>1</sup>, К.А. Храповицкая<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> УО Гродненский государственный медицинский университет Минздрава Республики Беларусь, Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup> ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме. Введение.** Роль нейроглобина при ишемии все еще неясна. В одних исследованиях указывается на его нейропротекторное действие за счет повышенной экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. Другие данные опровергают его значение для выживания нейронов в условиях недостатка кислорода, так как дефицит нейроглобина, по-видимому, увеличивает экспрессию HIF-1 $\alpha$ .

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 56 самцах беспородных белых крыс массой 258 $\pm$ 18 граммов. Тотальную ишемию головного мозга моделировали путем декапитации животных, субтотальную – методом одномоментной перевязки обеих общих сонных артерий. Ступенчатую субтотальную ишемию осуществляли с помощью перевязки обеих общих сонных артерий с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3 суток (подгруппа 2) или 1 сутки (подгруппа 3).

**Результаты.** По сравнению с показателями в группе «контроль» в 1-й подгруппе (промежуток между перевязками 7 суток) происходило увеличение содержания нейроглобина – на 13% в теменной коре ( $p<0,05$ ) и на 14% в гиппокампе ( $p<0,05$ ), во 2-й подгруппе (промежуток между перевязками 3 суток) содержание нейроглобина уменьшилось – на 13% в теменной коре ( $p<0,05$ ) и на 7% в гиппокампе ( $p<0,05$ ), а в 3-й подгруппе отмечалось наибольшее снижение содержания нейроглобина – на 31%,  $p<0,05$  и на 33%,  $p<0,05$ , соответственно.

В 3-й подгруппе (интервал между перевязками 1 сутки) содержание нейроглобина была меньше по сравнению с 1-й подгруппой на 40% в теменной коре ( $p<0,05$ ) и на 42,6% в гиппокампе ( $p<0,05$ ), а по сравнению со 2-й подгруппой – на 21% ( $p<0,05$ ) и на 28% ( $p<0,05$ ), соответственно.

**Заключение.** Таким образом, наиболее выраженные нарушения прооксидантно-оксидантного баланса, а также уменьшение содержания нейроглобина наблюдались при тотальной ишемии головного мозга продолжительностью 1 сутки.

**Ключевые слова:** нейроглобин, ишемия, пирамидные нейроны, гиппокамп, теменная доля коры

**Для корреспонденции:** Елизавета Игоревна Бонь. E-mail: asphodela@list.ru

**Для цитирования:** Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Карнюшко О.А., Лазарев В.Ф., Зиматкин С.М., Носович М.А., Храповицкая К.А. Содержание нейроглобина в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс с церебральной ишемией различной степени тяжести. Клини. эксп. морфология. 2023;12(3):64–71. DOI: 10.31088/SEM2023.12.3.64-71.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.1 «Экспериментальная медицина», и научно-исследовательской работы 4.1.1 «Изучить процессы повреждения и адаптации головного мозга при его ишемии и использовании коррекции».

Статья поступила 13.07.2022. Получена после рецензирования 12.09.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## The content of neuroglobin in neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats with cerebral ischemia of varying severity

*E.I. Bon<sup>1</sup>, N.E. Maksimovich<sup>1</sup>, O.A. Karnyushko<sup>1</sup>, V.F. Lazarev<sup>2</sup>,  
S.M. Zimatkin<sup>1</sup>, M.A. Nosovich<sup>1</sup>, K.A. Khrapovitskaya<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

<sup>2</sup> Institute of Cytology, Saint Petersburg, Russia

**Abstract. Introduction.** The role of neuroglobin ischemia is still unclear. Some studies indicate its neuroprotective effect due to increased expression of endothelial NOS. Other evidence refutes its significance for



neuronal survival under oxygen-deficient conditions, as neuroglobin deficiency appears to increase HIF-1 $\alpha$  expression.

*Materials and methods.* The experiments were performed on 56 male outbred white rats weighing 258 $\pm$ 18 g. Total cerebral ischemia was simulated by decapitation of animals, whereas the subtotal one was simulated by simultaneous ligation of both carotid arteries. Stepwise subtotal cerebral ischemia was performed by ligating both carotid arteries with an interval of 7 days (subgroup 1), 3 days (subgroup 2), or 1 day (subgroup 3).

*Results.* The study found significant differences in neuroglobin content across three subgroups. In subgroup 1, there was a notable increase in neuroglobin content compared to the control group, with a 13% increase in the parietal cortex ( $p<0.05$ ) and a 14% increase in the hippocampus ( $p<0.05$ ). However, subgroup 2 showed a decrease in neuroglobin content, with a 13% decrease in the parietal cortex ( $p<0.05$ ) and a 7% decrease in the hippocampus ( $p<0.05$ ). The most significant decrease in neuroglobin content was observed in subgroup 3, with a 31% decrease ( $p<0.05$ ) in the parietal cortex and a 33% decrease ( $p<0.05$ ) in the hippocampus. In subgroup 3, the parietal cortex showed a 40% decrease in neuroglobin content compared to subgroup 1 ( $p<0.05$ ) and a 21% decrease compared to subgroup 2 ( $p<0.05$ ). Similarly, the hippocampus exhibited a 42.6% decrease in neuroglobin content compared to subgroup 1 ( $p<0.05$ ) and a 28% decrease compared to subgroup 2 ( $p<0.05$ ).

*Conclusion.* Thus, the most pronounced disorders of the prooxidant-oxidant balance decreased neuroglobin were observed during a 1-day total cerebral ischemia.

**Keywords:** neuroglobin, ischemia, pyramidal neurons, hippocampus, parietal cortex

**Corresponding author:** Elizaveta I. Bon. E-mail: asphodela@list.ru

**For citation:** Bon E.I., Maksimovich N.E., Karnyushko O.A., Lazarev V.F., Zimatkin S.M., Nosovich M.A., Khrapovitskaya K.A. The content of neuroglobin in neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats with cerebral ischemia of varying severity. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):64–71 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.64-71.

**Funding.** The study was carried out within the framework of the State Scientific and Technical Program “Translational Medicine”, subprogram 4.1 “Experimental Medicine” and Research project 4.1.1 “To study the processes of damage and adaptation of the brain during its ischemia and the use of correction.”

**Received** 13.07.2022. **Received in revised form** 12.09.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

Как известно, недостаток снабжения кислородом нейронов головного мозга приводит к ряду морфо-функциональных изменений патологического характера. Так, снижается энергоснабжение нервных клеток, что, в свою очередь, влечет за собой нарушение постоянства внутренней среды клеток, приводя к нарушениям работы энзимов, каналов и повреждению цитолеммы [1, 2]. Передача сигналов от нейрона к нейрону также нарушается вследствие дезактивации синаптического аппарата. Что касается кровоснабжения и микроциркуляции, в условиях гипоксии часто наблюдается вазоконстрикция, повышается риск образования тромбов и формирования стаза [3–5].

Нейроглобин содержит в себе атом железа, который располагается в центре молекулы, а также белковую часть. Принадлежит нейроглобин к классу глобинов, и его строение дает некоторые основания для предположения об участии в снабжении клеток кислородом [6]. Однако из-за высокого сродства данной молекулы к кислороду считается, что функция нейроглобина заключается, скорее всего, в доставке кислорода к митохондриям. Подтверждается это предположение тем, что содержание нейроглобина, как правило, выше в тех клетках, которые проявляют наибольшую метаболическую активность [7–9].

Нейроглобин находят в разных тканях организма, как правило в нейронах центральной и периферической нервной системы и ряде эндокринных желез [6]. Клеточная локализация – цитозоль, митохондрии, нейрофиламенты; может располагаться и в карิโอплазме [10].

Роль нейроглобина при гипоксии/ишемии все еще неясна. В одних исследованиях указывается на его нейропротекторное действие при церебральной ишемии за счет повышенной экспрессии эндотелиальной NO-синтазы [11, 12]. Другие данные опровергают его значение для выживания нейронов в условиях недостатка кислорода, так как дефицит нейроглобина, по видимому, увеличивает экспрессию HIF-1 $\alpha$  [13].

Таким образом, нейроглобин, согласно данным литературы, может выступать в роли нейропротектора при церебральной ишемии, однако его содержание в нейронах головного мозга при ишемии остается неизученным, поэтому целью нашего исследования было оценить содержание нейроглобина в головном мозге крыс с ишемией головного мозга различной степени тяжести.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на 56 самцах беспородных белых крыс массой 258 $\pm$ 18 граммов. При проведении эксперимента соблюдались постановления директивы № 2010/63/ЕС Европейского парламента

и совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей», получено разрешение комитета по биомедицинской этике и деонтологии Гродненского медицинского государственного университета (выписка из протокола № 1 от 05.01.2022).

Для анестезии животных использовали тиопентал (40–50 мг/кг, внутривенно).

Для проведения исследования выбран ряд моделей церебральной ишемии: тотальная ишемия головного мозга (ТИГМ), субтотальная ишемия головного мозга (СИГМ), ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга (ССИГМ) и частичная ишемия головного мозга (ЧИГМ) [14, 15].

Тотальную ишемию головного мозга моделировали путем декапитации животных. Взятие материала осуществляли через 1 час после декапитации.

Субтотальную ишемию головного мозга моделировали методом одномоментной перевязки обеих общих сонных артерий. Взятие материала осуществляли через 1 час после операции.

Ступенчатую субтотальную ишемию головного мозга выполняли с помощью перевязки обеих общих сонных артерий с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3 суток (подгруппа 2) или 1 сутки (подгруппа 3). Материал забирали через 1 час после перевязки второй общей сонной артерии в каждой из подгрупп.

Частичную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки одной общей сонной артерии справа. Взятие материала осуществляли через 1 час после операции.

В группу «контроль» вошли ложно оперированные животные схожего возраста и веса.

Содержание нейроглобина определяли иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител. С этой целью необходимые для исследования отделы головного мозга крыс помещали в специальный фиксатор (цинк-этанол-формальдегид) на 12 часов при температуре окружающей среды +4°C, после чего ткани заключали в парафин.

Согласно данным литературы, неокортекс, к которому относится теменная кора, и поле CA<sub>1</sub> гиппокампа являются наиболее чувствительными к гипоксии отделами головного мозга [5]. Выбор пирамидных нейронов пятого слоя теменной коры и пирамидных нейронов гиппокампа обусловлен их функциональной значимостью. Пирамидные нейроны пятого слоя теменной коры головного мозга обладают богатой системой дендритных и аксонных ветвлений, образующих сложную сеть коллатералей в пределах коры, формируя внутрикорковые ассоциативные связи. Пирамидные нейроны гиппокампа имеют обширные ветвления дендритов в других слоях и генерируют рекуррентное возбуждение, осуществляя важный механизм формирования памяти [4, 5, 7].

Срезы коры головного мозга крыс толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме Leica 2125 RTS (Германия). Для исключения теплового демаскирования

антигенов использовали специальный протокол иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии. Для выявления нейроглобина применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Neuroglobin antibody [13C8] (Abcam, Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:600 при температуре +4°C, экспозиция 20 часов, во влажной камере [16]. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam, Великобритания, ab. 80436). Отрицательным контролем служили препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали 1% раствором BSA в фосфатно-солевом буфере. В роли внутреннего положительного контроля выступали структуры с известным высоким содержанием нейроглобина, а в роли отрицательного – ядра нервных клеток и оболочки головного мозга. Также для повышения точности исследования содержание нейроглобина определяли только в цитоплазме изучаемых нервных клеток.

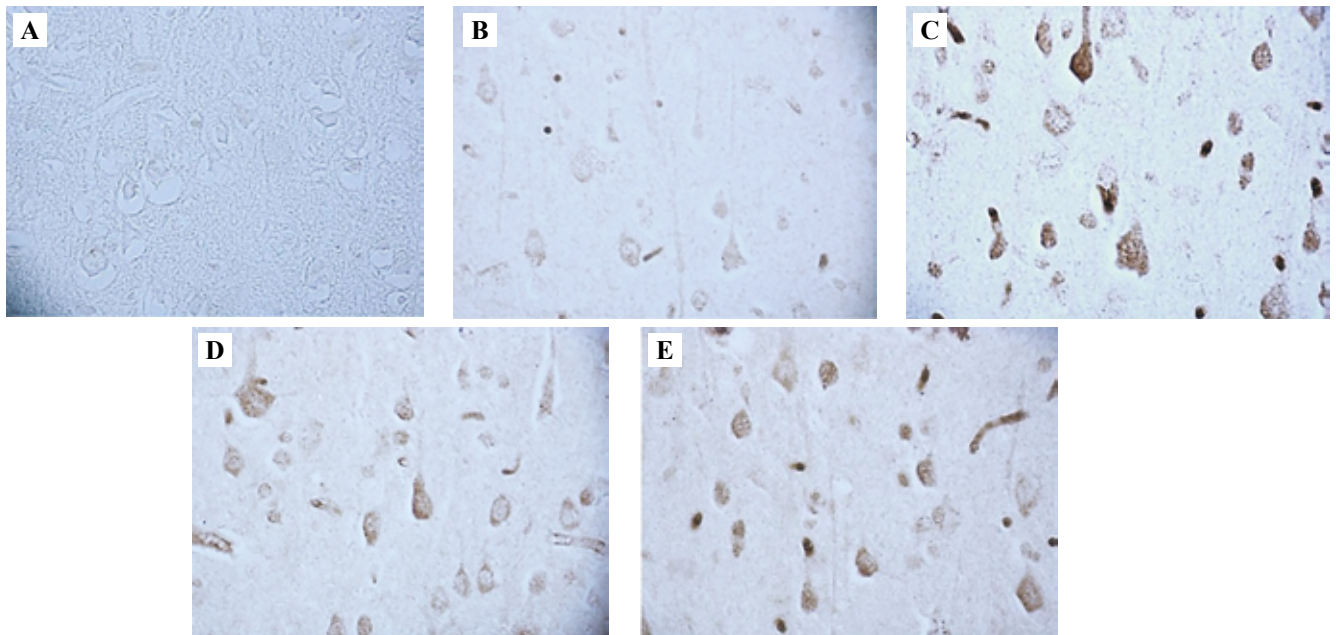
Нейроглобин выявляли в цитоплазме нейронов пятого слоя теменной коры и нейронов поля CA<sub>1</sub> гиппокампа в иммуногистохимических препаратах на основе величины оптической плотности осадка хромогена (метод денситометрии на максимуме поглощения диаминобензидина) с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы головного мозга от сравниваемых контрольной и опытных групп животных изучали в одинаковых условиях.

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. В эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, поэтому анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$  (тест Краскела–Уоллиса с поправкой Бонфферони).

## Результаты

В ходе исследования обнаружено, что характер морфологических изменений был неоднотипным (табл.). При тотальной церебральной ишемии отмечено уменьшение содержания нейроглобина по сравнению с контролем (рис. 1 E, 2 E) – на 69,1% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) (рис. 1 A) и на 68,2% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ) (рис. 2 A). При этом различия в содержании нейроглобина в теменной коре и гиппокампе отсутствовали ( $p > 0,05$ ).

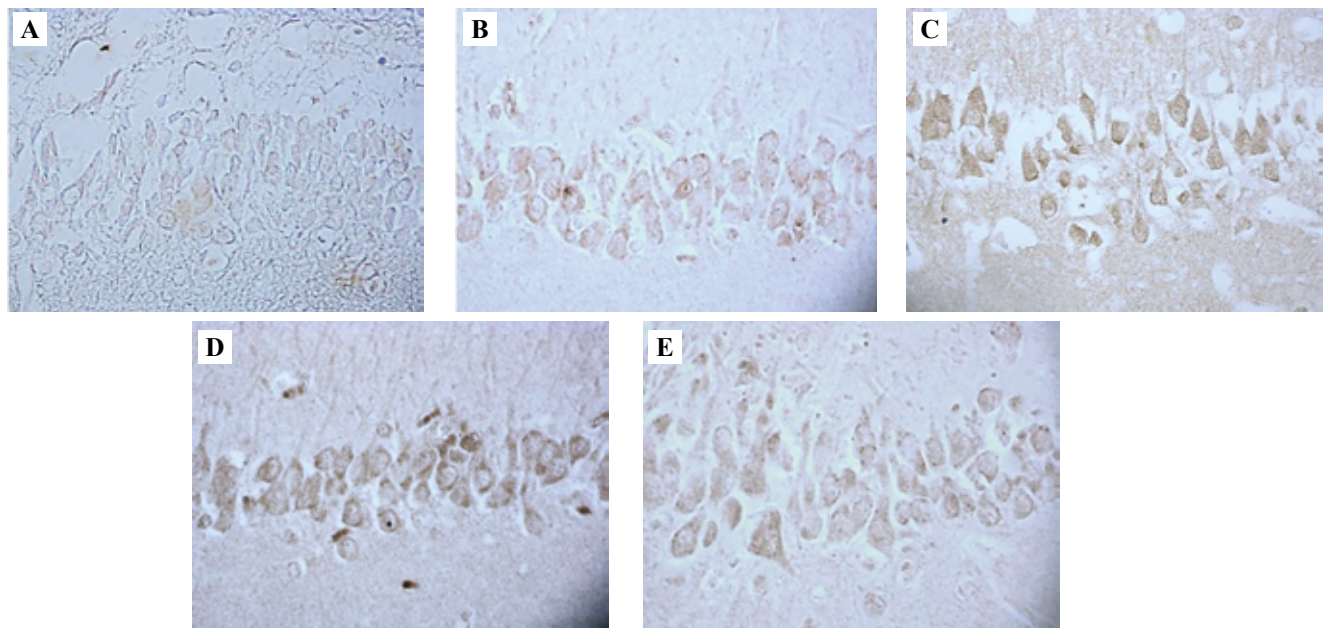


*Рис. 1.* Содержание нейроглобина в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры.

A – у крыс с тотальной ишемией головного мозга (ТИГМ) через 1 час, B – у крыс с субтотальной ишемией головного мозга (СИГМ) через 1 час, C – у крыс со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга (ССИГМ) через 1 сутки, подгруппа 1, D – у крыс с частичной ишемией головного мозга (ЧИГМ) через 1 час, E – контроль. ИГХ окрашивание с антителами к нейроглобину,  $\times 40$

*Fig. 1.* The content of neuroglobin in the cytoplasm of the pyramidal neurons of the parietal cortex.

A – in rats with total cerebral ischemia (TCI) after 1 hour; B – in rats with subtotal cerebral ischemia (SCI) after 1 hour; C – in rats with stepwise subtotal ischemia (SSCI) after 1 day, subgroup 1, D – in rats with partial cerebral ischemia (PCI) after 1 hour, E – control. IHC assay with neuroglobin antibodies,  $\times 40$



*Рис. 2.* Содержание нейроглобина в цитоплазме пирамидных нейронов поля CA<sub>1</sub> гиппокампа.

A – у крыс с тотальной ишемией головного мозга (ТИГМ) через 1 час, B – у крыс с субтотальной ишемией головного мозга (СИГМ) через 1 час, C – у крыс со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга (ССИГМ) через 1 сутки, подгруппа 1, D – у крыс с частичной ишемией головного мозга (ЧИГМ) через 1 час, E – контроль. ИГХ окрашивание с антителами к нейроглобину,  $\times 40$

*Fig. 2.* The content of neuroglobin in the cytoplasm of the pyramidal neurons of hippocampal field CA<sub>1</sub>.

A – in rats with total cerebral ischemia (TCI) after 1 hour, B – in rats with subtotal cerebral ischemia (SCI) after 1 hour, C – in rats with stepwise subtotal (SSCI) after 1 day, subgroup 1, D – in rats with partial cerebral ischemia (PCI) after 1 hour, E – control. IHC assay with neuroglobin antibodies,  $\times 40$

Содержание нейроглобина в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры и поля CA<sub>1</sub> гиппокампа головного мозга крыс с ишемией головного мозга, Me (LQ; UQ) |  
The content of neuroglobin in the cytoplasm of pyramidal neurons of the parietal cortex and hippocampal field CA<sub>1</sub> in rats with cerebral ischemia, Me (LQ; UQ)

Группы   Groups		Содержание нейроглобина/единицы оптической плотности   The content of neuroglobin/units of optical density	
		теменная кора   parietal cortex	гиппокамп   hippocampus
Контроль   Control		0,167 (0,162; 0,172)	0,165 (0,163; 0,165)
ТИГМ   TCI		0,051 (0,049; 0,052)*	0,052 (0,049; 0,054)*
СИГМ   SCI		0,114 (0,108; 0,116)*	0,117 (0,107; 0,126)*
ЧИГМ   PCI		0,166 (0,163; 0,175)	0,162 (0,158; 0,166)
ССИГМ   SSCI	подгруппа 1   subgroup 1	0,191 (0,186; 0,193)*	0,192 (0,191; 0,216)*
	подгруппа 2   subgroup 2	0,145 (0,142; 0,152)*	0,153 (0,149; 0,158)*
	подгруппа 3   subgroup 3	0,115 (0,111; 0,123)*	0,111 (0,108; 0,117)

\* – различия статистически значимы относительно группы контроля ( $p < 0,05$ , тест Краскела–Уоллиса с поправкой Бонферони). ТИГМ – тотальная ишемия головного мозга, СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга, ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга, ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга

\* – differences are statistically significant relative to the control group ( $p < 0,05$ , Kruskal–Wallis test with Bonferroni correction). TCI – total cerebral ischemia, SCI – subtotal cerebral ischemia, SSCI – subtotal stepwise cerebral ischemia, PCI – partial cerebral ischemia

По сравнению с контролем в группе СИГМ содержание нейроглобина уменьшилось – на 32,1% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) (рис. 1 В) и на 28,7% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ) (рис. 2 В). По сравнению с группой ТИГМ содержание нейроглобина у крыс с СИГМ было больше – в теменной коре на 55,4% ( $p < 0,05$ ) и в гиппокампе на 55,9% ( $p < 0,05$ ). Уменьшение содержания нейроглобина у крыс с СИГМ было менее выраженным, чем у крыс с ТИГМ, – на 23,1% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 27,3% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ).

При этом в группе ЧИГМ по сравнению с группой ТИГМ содержание нейроглобина в цитоплазме нейронов была больше – на 68,7% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 69,2% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), а по сравнению с группой СИГМ – на 31,8% ( $p < 0,05$ ) и на 28,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

По сравнению с параметрами в группе «контроль» при промежутке между перевязками общих сонных артерий 7 суток (1-я подгруппа ССИГМ) происходило увеличение содержания нейроглобина – на 12,9% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) (рис. 1 С) и на 14,2% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ) (рис. 2 С), во 2-й подгруппе ССИГМ (промежуток между перевязками 3 суток) содержание нейроглобина уменьшилось – на 13,4% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 7,1% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), а в 3-й подгруппе отмечалось наибольшее снижение содержания

нейроглобина – на 30,8% ( $p < 0,05$ ) и на 33,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

При интервале между перевязками общих сонных артерий 1 сутки (3-я подгруппа ССИГМ) содержание нейроглобина была меньше по сравнению с 1-й подгруппой – на 39,9% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 42,7% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), а по сравнению со 2-й подгруппой ССИГМ – на 21,3% ( $p < 0,05$ ) и на 28,1% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

По сравнению с СИГМ, моделируемой одномоментной перевязкой обеих общих сонных артерий, в 3-й подгруппе ССИГМ в обоих изучаемых отделах различия в содержании нейроглобина в цитоплазме нейронов не выявлены ( $p > 0,05$ ). Содержание нейроглобина во 2-й подгруппе ССИГМ было на 21,2% больше, чем при СИГМ, в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 23,7% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), а в 1-й подгруппе ССИГМ – на 40,3% ( $p < 0,05$ ) и на 39,2% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

У крыс с ЧИГМ не были выявлены изменения содержания нейроглобина по отношению к уровню в контрольной группе ( $p > 0,05$ ) (рис. 1 D, 2 D).

По сравнению с группой ЧИГМ в 1-й подгруппе ССИГМ содержание нейроглобина было на 13% больше в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 16% в гиппокампе ( $p < 0,05$ ). Во 2-й подгруппе ССИГМ оно было меньше на 13% (9; 17) в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 12% (9; 22)

в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), а в 3-й подгруппе ССИГМ уменьшение содержания нейроглобина было более выраженными, и составило 31% ( $p < 0,05$ ) и 28% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

### Обсуждение

Таким образом, содержание нейроглобина значительно уменьшалось при ТИГМ и СИГМ, в меньшей степени в 1-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками 7 суток.

Изменения содержания нейроглобина в 1-й, 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ были разнонаправленными: в 1-й подгруппе с максимальным интервалом между перевязками общих сонных артерий 7 суток оно увеличивалось, свидетельствуя об активации механизмов компенсации при гипоксии путем более активной транспортировки кислорода к митохондриям нервных клеток. Но по мере того как временной промежуток между перевязками артерий становился все короче, содержание нейроглобина снижалось, указывая на недостаточное включение механизмов компенсации при более тяжелых формах церебральной ишемии.

При анализе динамики изменения нейроглобина при ступенчатой ишемии можно сделать вывод, что в 1-й подгруппе ССИГМ его содержание наиболее близко к показателям в группах «контроль» и ЧИГМ.

Это может служить знаком того, что в 1-й подгруппе ССИГМ наблюдается активация компенсаторных механизмов нейронов. Они, вероятно, заключаются в увеличении активности аэробного гликолиза, что становится возможным благодаря доставке кислорода к митохондриям нейроглобином [17–21].

В то же время во 2-й и 3-й подгруппах ступенчатой ишемии содержание нейроглобина приближается к таковому при СИГМ.

Повышенное содержание нейроглобина в цитоплазме нейронов в 1-й подгруппе ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с перевязкой обеих общих сонных артерий с интервалом 7 суток также может способствовать оптимизации поступления кислорода в митохондрии. Кроме того, нейроглобин является сквенджером свободных радикалов, что способствует нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга на свободнорадикальном этапе [20–22].

### Заключение

Наиболее выраженное уменьшение содержания нейроглобина происходит при тотальной ишемии головного мозга, а также при субтотальной ишемии и в той подгруппе ступенчатой, где промежуток между перевязками общих сонных артерий составил 1 сутки. В то же время частичная ишемия не сопровождалась значимыми изменениями содержания нейроглобина, а ступенчатая перевязка общих сонных артерий с промежуток 7 суток даже способствовала повышению содержания данного металлопротеина.

Полученные в ходе проведенного исследования сведения могут помочь в дальнейшем углубить имеющиеся данные о патогенезе гипоксических повреждений мозга. В первую очередь это касается формирования энергетического дефицита при гипоксии нейронов. В перспективе, возможно, полученные сведения лягут в основу будущих разработок методов предотвращения и терапии цереброваскулярной патологии.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.Е. Максимович,

С.М. Зиматкин, В.Ф. Лазарев.

Сбор и обработка материала – Е.И. Бонь, О.А. Карнюшко,

М.А. Носович, К.А. Храповицкая.

Написание текста – Е.И. Бонь.

Редактирование – Н.Е. Максимович.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment –

N.E. Maksimovich, S.M. Zimatkin, V.F. Lazarev.

Collected the data and performed the analysis – E.I. Bon,

O.A. Karnyushko, M.A. Nosovich, K.A. Khrapovitskaya.

Wrote the paper – E.I. Bon.

Edited the manuscript – N.E. Maksimovich.

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

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

### Литература/References

1. *Жаркинбекова Н.А.* Хроническая ишемия мозга: обзор публикаций, патогенетические подходы к терапии. Медицина (Алматы). 2020;3–4(213–214):64–73. DOI: 10.31082/1728-452X-2020-213-214-3-4-64-73.  
*Zharkinbekova NA.* Chronic cerebral ischemia: review of published works, pathogenetic approaches to therapy. Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty). 2020;3–4(213–214):64–73 (In Russ.). DOI: 10.31082/1728-452X-2020-213-214-3-4-64-73.
2. *Kim SD, Kim M, Wu HH, Jin BK, Jeon MS, Song YS.* Prunus cerasoides extract and its component compounds upregulate neuronal neuroglobin levels, mediate antioxidant effects, and ameliorate functional losses in the mouse model of cerebral ischemia. Antioxidants (Basel). 2021;11(1):99. DOI: 10.3390/antiox11010099.
3. *Поспелова М.Л., Алексеева Т.М., Рыжкова Д.В., Ефимова М.Ю., Лепехина А.С., Герасимов А.П. и др.* Состояние когнитивных функций и перфузии головного мозга при хронической ишемии мозга на фоне асимптомного каротидного атеросклероза. Современные проблемы науки и образования. 2020;6:182. DOI: 10.17513/spno.30446.  
*Pospelova ML, Alekseeva TM, Ryzhkova DV, Efimova MYu, Lepekhina AS, Gerasimov AP et al.* The state of cognitive functions and brain perfusion in chronic brain ischemia against the background of asymptomatic carotid atherosclerosis. Modern problems of science and education. 2020;6:182 (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.30446.
4. *Максимович Н.Е., Бонь Е.И., Зиматкин С.М.* Головной мозг крысы и его реакция на ишемию: Монография. Гродно:

- ГрГМУ, 2021. 240 с. Доступно по адресу: <http://elib.grsmu.by/handle/files/26327> (получено 01.07.2022).
- Maksimovich NE, Bon EI, Zimatkin SM.* Rat brain and its response to ischemia: monograph. Grodno: GrGMU, 2021. 240 p. (In Russ.). Available from: <http://elib.grsmu.by/handle/files/26327> (accessed 01.07.2022).
5. Sun W, Chen Y, Zhan Y, Geng Y, Tang X, Guo R et al. A modified four vessel occlusion model of global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Methods.* 2021;352:109090. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2021.109090.
  6. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга. *Оренбургский медицинский вестник.* 2021;9(2):29–36. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=46180597> (получено 01.07.2022).
  - Bon EI, Maksimovich NE.* Comparative analysis of morphological disturbances of the neurons of the rats parietal cortex and hippocampus in different types of experimental brain ischemia. *Orenburg Medical Herald.* 2021;9(2):29–36 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=46180597> (accessed 01.07.2022).
  7. Yuan D, Liu Ch, Hu B. Dysfunction of membrane trafficking leads to ischemia-reperfusion injury after transient cerebral ischemia. *Transl Stroke Res.* 2018;9(3):215–22. DOI: 10.1007/s12975-017-0572-0.
  8. Саркисян К.Х., Поздняков Д.И. Сравнительное изучение экспериментальных моделей фокальной церебральной ишемии. *Современные проблемы науки и образования.* 2021;5:84. DOI: 10.17513/spno.31124.
  - Sarkisyan KKh, Pozdnyakov DI.* Comparative study of experimental models of focal cerebral ischemia. *Modern problems of science and education.* 2021;5:84 (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.31124.
  9. Konoplya AI, Bystrova NA, Shulginova AA, Sunyaikina OA, Dolgareva SA, Khorlyakova OV. Metabolic and neuropsychic status in chronic brain ischemia: Correction of disorders. *Drug Invention Today.* 2019;12(11):2741–7. Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43259856> (accessed 01.07.2022).
  10. Смирнов А.В., Горелик Е.В., Григорьева Н.В., Шмидт М.В., Тюренков И.Н., Туманов В.П. Морфофункциональные механизмы повреждения нейронов при ишемии головного мозга. *Волгоградский научно-медицинский журнал.* 2022;1:5–10. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=48285170> (получено 01.07.2022).
  - Smirnov AV, Gorelik EV, Grigorieva NV, Schmidt MV, Tyurenkov IN, Tumanov VP.* Morphofunctional mechanisms of neuronal injury in cerebral ischemia. *Volgograd scientific and medical journal.* 2022;1:5–10 (In Russ.). Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=48285170> (accessed 01.07.2022).
  11. Wen H, Lui L, Zhan L, Liang D, Li L, Liu D et al. Neuroglobin mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against transient global cerebral ischemia in rats through preserving the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPases. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):635. DOI: 10.1038/s41419-018-0656-0.
  12. Xiong XX, Pan F, Chen RQ, Hu DX, Qui XY, Li CY et al. Neuroglobin boosts axon regeneration during ischemic reperfusion via p38 binding and activation depending on oxygen signal. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):163. DOI: 10.1038/s41419-017-0260-8.
  13. Fiocchetti M, Cracco P, Montalesi E, Solar Fernandez V, Stuart JA, Marino M. Neuroglobin and mitochondria: The impact on neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys.* 2021;701:108823. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108823.
  14. Узлова Е.В., Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах мозга при экспериментальной церебральной ишемии. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(1):68–76. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.68-76.
  - Uzlova EV, Zimatkin SM, Bon EI.* Changes in the content of ATP synthase in brain neurons during experimental cerebral ischemia. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):68–76 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.68-76.
  15. Gao Y, Yin H, Zhang Y, Dong Y, Yang F, Wu X et al. Dexmedetomidine protects hippocampal neurons against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis through activation HIF-1 $\alpha$ /p53 signaling. *Life Sci.* 2019;232:116611. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116611.
  16. 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. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
  - Egorova AV, Voronkov DN, Fedorova EN, Baranich TI, Glinkina VV, Sukhorukov VS.* Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(2):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
  17. Ding C, Kang D, Chen P, Wang Z, Lin Y, Wang D et al. Early stage neuroglobin level as a predictor of delayed cerebral ischemia in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Brain Behav.* 2020;10(3):e01547. DOI: 10.1002/brb3.1547.
  18. Devyatov AA, Fedorova TN, Berezhnoy DS, Stvolinskii SL, Tutelyan VA. Mechanisms of neuroprotective action of hesperetin and carnosine in focal ischemia of the brain in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(2):242–5. DOI: 10.1007/s10517-020-04859-w.
  19. Lyden P. Selective cerebral cooling for acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;40(7):1365–7. DOI: 10.1177/0271678X20925026.
  20. Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(26):15306–11. DOI: 10.1073/pnas.251466698.
  21. Peinado MA, Ovelheiro D, Del Moral ML, Hernández R, Martínez-Lara E, Siles E et al. Biological implications of a stroke therapy based in neuroglobin hyaluronate nanoparticles. *Neuroprotective role and molecular bases.* *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):247. DOI: 10.3390/ijms23010247.
  22. Ciccone L, Nencetti S, Socci S, Orlandini E. Neuroglobin and neuroprotection: The role of natural and synthetic compounds in neuroglobin pharmacological induction. *Neural Regen Res.* 2021;16(12):2353–8. DOI: 10.4103/1673-5374.300981.

**Информация об авторах**

Елизавета Игоревна Бонь – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии имени Д.А. Маслакова Гродненского государственного медицинского университета.

Наталья Евгеньевна Максимович – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии имени Д.А. Маслакова Гродненского государственного медицинского университета.

Ольга Анатольевна Карнюшко – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета.

Владимир Федорович Лазарев – кандидат биологических наук, доцент Института цитологии РАН.

Сергей Михайлович Зиматкин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета.

Мирослав Алексеевич Носович – студент 5-го курса педиатрического факультета Гродненского государственного медицинского университета.

Ксения Александровна Храповицкая – студентка 5-го курса педиатрического факультета Гродненского государственного медицинского университета.

**Author information**

Elizaveta I. Bon – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, D.A. Maslakov Department of Pathological Physiology, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7189-0838>

Natalia E. Maksimovich – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the D.A. Maslakov Department of Pathological Physiology, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-3181-9513>

Olga A. Karnyushko – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-2309-1542>

Vladimir F. Lazarev – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Institute of Cytology.  
<https://orcid.org/0000-0003-0387-4515>

Sergey M. Zimatkin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>

Miroslav A. Nosovich – 5th-year Student, Pediatric Faculty, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-0090-7254>

Ksenia A. Khrapovitskaya – 5th-year Student, Pediatric Faculty, Grodno State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7580-7915>

## Реакция нейроэндокринных клеток и макрофагов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке

*М.Н. Михайлова, О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, И.С. Стоменская, О.Ю. Кострова*

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

**Резюме. Введение.** Высокая распространенность онкологических заболеваний требует от современной медицины поиска новых путей всестороннего изучения канцерогенеза. Важной задачей является исследование нейроэндокринных механизмов реакции и взаимодействия клеток иммунных органов в патогенезе развития опухолей. Цель настоящей работы – изучение Synaptophysin<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>-клеток и биогенных аминов в селезенке крыс при развитии опухоли в толстой кишке на этапах формирования дисплазии и аденокарциномы.

**Материалы и методы.** Гистологические срезы селезенки 110 половозрелых нелинейных крыс-самцов через 1 и 4 месяца после введения канцерогена 1,2-диметилгидразина изучены с помощью иммуногистохимических, морфометрических и люминесцентно-гистохимических методов.

**Результаты.** На фоне предопухолевых изменений в толстой кишке (через 1 месяц после введения канцерогена) в селезенке наблюдаются дисбаланс продукции биогенных аминов – серотонина, гистамина, катехоламинов и, соответственно, снижение функциональной активности клеток герминативных центров лимфоидных узелков, а также некоторая активация клеток периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) и красной пульпы. В это же время отмечается увеличение числа CD68<sup>+</sup>-макрофагов и Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток в красной пульпе. На этапе развития аденокарциномы (через 4 месяца после введения канцерогена) значительно возрастают уровень катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках ПАЛМ и функциональная активность данных клеток. При этом численность макрофагов снижается во всех изучаемых компартментах селезенки, а количество Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток на фоне снижения уровня всех биогенных аминов в красной пульпе возрастает еще больше.

**Заключение.** На процесс канцерогенеза в толстой кишке реагируют клетки всех компартментов селезенки. Наиболее выражена реактивность клеток ПАЛМ и красной пульпы. Быстрым изменениям подвергается популяция макрофагов селезенки: на фоне предопухолевых процессов их количество возрастает в красной пульпе, тогда как на этапе развития аденокарциномы, наоборот, снижается во всех структурах селезенки. Важную роль в реакции селезенки на развитие опухоли играют Synaptophysin<sup>+</sup> нейроэндокринные клетки красной пульпы, численность которых в динамике возрастает. Непосредственное участие в процессах взаимодействия клеток селезенки между собой и с опухольассоциированными клетками принимают биогенные амины.

**Ключевые слова:** селезенка, биогенные амины, нейроэндокринные клетки, синаптофизин, канцерогенез

**Для корреспонденции:** Марина Николаевна Михайлова. E-mail: mar3007@mail.ru

**Для цитирования:** Михайлова М.Н., Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Стоменская И.С., Кострова О.Ю. Реакция нейроэндокринных клеток и макрофагов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке. Клин. эксп. морфология. 2023;12(3):72–81. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.72-81.

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

Статья поступила 12.08.2022. Получена после рецензирования 29.09.2022. Принята в печать 12.12.2022.

## Response of neuroendocrine cells and splenic macrophages to tumor development in the colon

*M.N. Mikhailova, O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko, L.M. Merkulova, I.S. Stomenskaya, O.Yu. Kostrova*

IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

**Abstract. Introduction.** High cancer incidence requires finding new ways for comprehensive studying carcinogenesis. Therefore, it is crucial to understand immune organ cell response and cell interaction in tumor



development. The aim of the research was to study Synaptophysin<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>-cells, and biogenic amines in rat spleens during tumor development in the colon during dysplasia stages and adenocarcinoma formation. *Materials and methods.* Spleen histological slides of 110 mature male rats were studied 1 and 4 months after 1,2-dimethylhydrazine carcinogen administration using immunohistochemical, morphometric, and luminescent histochemical methods.

*Results.* We found imbalanced production of biogenic amines (serotonin, histamine, and catecholamines) in the spleen and, therefore, a decrease in the cellular activity of the germinal centers of the lymphoid nodules. We also observed activation of periarteriolar lymphoid sheath (PALS) and red pulp in rats with precancerous colon lesions (1 month after carcinogen administration). At the same time, there was an increase in the number of CD68<sup>+</sup> macrophages and Synaptophysin<sup>+</sup> cells in the red pulp. In animals with adenocarcinoma (4 months after carcinogen introduction), the level of catecholamines in the luminescent granular cells of the PALS and the functional activity of these cells increased significantly. Simultaneously, the number of macrophages decreased in all the studied spleen compartments. Amid the decreased level of all biogenic amines in the red pulp, the quantity of Synaptophysin<sup>+</sup> cells grew even more.

*Conclusion.* The cells of all spleen compartments react to colon carcinogenesis, with reactivity of PALS cells and the red pulp being the most pronounced. The population of spleen macrophages undergoes rapid changes: their number increases in the red pulp in animals with precancerous lesions, while it decreases in all the splenic structures of rats with adenocarcinoma. Synaptophysin<sup>+</sup> neuroendocrine cells of the red pulp play an important role in the reaction of the spleen to tumor development, and the number of these cells rises over time. Biogenic amines participate in the interaction of spleen cells with each other and with tumor-associated cells.

**Keywords:** spleen, biogenic amines, neuroendocrine cells, synaptophysin, carcinogenesis

**Corresponding author:** Marina N. Mikhailova. E-mail: mar3007@mail.ru

**For citation:** Mikhailova M.N., Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Stomenskaya I.S., Kostrova O.Yu. Response of neuroendocrine cells and splenic macrophages to tumor development in the colon. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):72–81 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.72-81.

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

**Received** 12.08.2022. **Received in revised form** 29.09.2022. **Accepted** 12.12.2022.

## Введение

По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР/IARC), в 2020 году рак колоректальной области занимал третье место среди всех впервые выявленных случаев в мире. Известно, что опухоли толстой кишки являются вторыми по частоте новообразованиями, которые выявляются на поздних стадиях канцерогенеза [1, 2]. Высокая распространенность онкологических заболеваний требует от исследователей поиска новых путей всестороннего изучения канцерогенеза. Среди активно развивающихся направлений экспериментальной и клинической иммунологии особое место занимает нейроиммуноэндокринология, предметом исследования которой является изучение экстраиммунных (нервных, гуморальных) механизмов регуляции функций иммунной системы в организме [3]. В литературе появляется все больше данных о значении взаимодействия нервной, иммунной и эндокринной систем в патогенезе воспалительных, аутоиммунных и онкологических процессов [4].

Известно, что в качестве главного вегетативного центра, регулирующего функции иммунной системы, выступает гипоталамус [3], способный напрямую влиять на цитотоксичность натуральных киллеров (НК-клеток) селезенки. Связь между гипоталамусом и иммунными органами осуществляется через нейромедиаторы, гормоны и другие нейропептиды, для которых на мембра-

не лимфоцитов и макрофагов имеются специфические рецепторы, в том числе к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК), серотонину (СТ), гистамину (ГСТ), катехоламинам (КА) и т.д. [3, 5, 6]. Иммунные клетки могут сами синтезировать и высвобождать нейротрансмиттеры, используя таким образом аутокринные и паракринные механизмы регуляции иммунного ответа [5]. Известно, что усиление влияния допаминергической и ГАМК-ергической систем приводит к активации иммуногенеза, а серотонинергической, напротив, к ослаблению иммунологической реактивности [3, 7]. При этом имеющиеся сведения о влиянии биогенных аминов на иммунные клетки носят противоречивый характер. Так, по одним данным, катехоловые амины (дофамин, адреналин, норадреналин) способствуют активации Т-, В-лимфоцитов, НК-клеток и фагоцитов [8]. По другим данным, они путем ускорения дифференцировки Т-супрессоров приводят к ингибированию антителообразования плазматическими [3], повышенные концентрации катехоламинов сопровождаются снижением активности НК-клеток [5].

Важную роль в реакции организма на стрессовые состояния, канцерогенные воздействия играют нейроэндокринные клетки APUD-системы (Amine Precursor Uptake Decarboxylation), которые присутствуют во многих органах, в том числе лимфоидных [3, 4, 9]. Влияние на рост и развитие опухолей они оказывают через вырабатываемые ими биологически активные

вещества, в том числе биогенные амины СТ, ГСТ и КА. При этом действие одних и тех же биоаминов может меняться на разных стадиях опухолевого роста. В зависимости от этиологического фактора разные амины могут выступать и в качестве активаторов, и в качестве ингибиторов клеточной пролиферации. Исследования показали, что развитие в организме злокачественной опухоли независимо от ее локализации и гистогенеза сопровождается изменениями структурно-функциональной организации апудоцитов [9].

Из литературы известно, что важную роль в нейроиммуноэндокринной регуляции противоопухолевого иммунного ответа играет селезенка, в том числе через макрофаги, дендритные клетки, клетки APUD-системы и вырабатываемые ими цитокины, нейромедиаторы и биогенные амины [7, 9–11]. Тем не менее роль клеток селезенки в процессах опухолевого роста недостаточно ясна. Нет понимания значения ее клеток и биологически активных факторов в феномене крайне редкого метастазирования в этот орган. В литературе имеются данные о морфологических изменениях, протекающих в селезенке при развитии опухоли в толстой кишке [12–14], однако многие вопросы о роли нейроэндокринных клеток и биогенных аминов селезенки в этом процессе остаются нераскрытыми. С учетом изложенного выше целью исследования стало изучение Synaptophysin<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>-клеток и биогенных аминов селезенки крыс при развитии опухоли в толстой кишке.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на 110 белых нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на три группы: 1-я – интактные крысы (n=30); 2-я – крысы через 1 месяц после введения канцерогена 1,2-диметилгидразина (n=40); 3-я – крысы через 4 месяца после введения этого же канцерогена (n=40). Канцероген начинали вводить по достижении крысами возраста 1 месяц. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено на заседании локального этического комитета медицинского факультета Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова (протокол № 20-01 от 29.01.2020).

Аденокарциному толстой кишки моделировали с помощью водного раствора 1,2-диметилгидразина (Acros organics, Бельгия) согласно модели R.F. Jacoby et al. (1991). С целью исключения влияния стрессового фактора от инъекций канцерогена на результаты исследования животным контрольной группы (n=30) внутрибрюшинно вводили изотонический раствор хлорида натрия в дозе 0,5 мл 1 раз в неделю в течение одного месяца. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации через 1 и 4 месяца после окончания курса инъекций 1,2-диметилгидразина. Объектом исследования служила селезенка.

Срезы селезенки изучали следующими методами.

*Иммуногистохимия.* Использовали моноклональные антитела (МКАТ) к кластеру дифференцировки 68 типа (CD68), клон ED-1 (Santa Cruz, США) и к Synaptophysin (Santa Cruz, США). Иммуногистохимические реакции визуализировали с помощью системы ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND (Leica Biosystems, Германия). Чувствительность и специфичность иммуногистохимических реакций оценивали с помощью неиммунизированной кроличьей сыворотки. Положительной иммуногистохимической реакцией на антитела считали коричневое окрашивание мембран. С помощью CD68 идентифицировали клетки макрофагальной природы [15], а с помощью Synaptophysin – клетки APUD-системы [10]. У всех животных 2-й и 3-й групп патоморфологически были подтверждены неопластические новообразования в толстой кишке: через 1 месяц после инъекций выявлялись умеренная дисплазия эпителия кишечных крипт в виде гиперхромии ядер, появление двуядерных клеток, псевдомногорядности эпителиального пласта, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения; через 4 месяца – аденокарцинома с высокой и умеренной степенью дифференцировки.

*Морфометрия.* Для количественной оценки использовали цифровые изображения микропрепаратов селезенки, полученные с помощью люминесцентного микроскопа «Микромед 3 Люм» («Микромед», Россия) и цифровой фотокамеры Canon DS126191 (Canon, Тайвань). Количественную оценку интенсивности мембранных иммуногистохимических реакций осуществляли с помощью программы «Микро-Анализ» (Labor-microscopes, Россия, 2010). На каждом срезе измерения проводили не менее чем в 10 полях зрения [16].

*Визуализация биогенных аминов.* Идентификацию серотонина и катехоламинов в структурах селезенки осуществляли с помощью люминесцентно-гистохимического метода В. Falck, N. Hillarp (1962) в модификации Е.М. Крохиной и П.Н. Александровой (1969), а идентификацию гистамина – с помощью люминесцентно-гистохимического метода S. Cross, S. Ewen, F. Rost (1971). Уровень биогенных аминов в структурах селезенки определяли цитоспектрофлуориметрически, используя люминесцентный микроскоп «Люмам-4» и фотонасадку ФМЭЛ-1А (АО «ЛМО», Россия) [16]. Содержание биогенных аминов оценивали в условных единицах флуоресценции по цифровым показаниям шкалы регистрирующего прибора-усилителя. Далее рассчитывали соотношение (СТ+ГСТ)/КА, повышение которого косвенно указывает на ослабление функциональной активности клеток, а снижение – на ее усиление.

Обработку цифровых данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США) с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики. Тип распределения устанавливали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае нормального

распределения данных применяли t-критерий Стьюдента и такие стандартные статистические показатели, как средняя арифметическая величина  $M$  и средняя ошибка средней  $m$ . При распределении, отличающемся от нормального, использовали U-критерий Манна–Уитни для двух групп и Краскела–Уоллиса при сравнении трех исследуемых групп, при этом выборки описывали через медиану ( $Me$ ), нижний и верхний квартили ( $Q1$  и  $Q3$ ). Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,01$ .

## Результаты

В регуляции локальных механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки в органах иммунной системы участвуют клетки, продуцирующие биогенные амины, названные люминесцирующими гранулярными клетками (ЛГК) [17]. К таким клеткам-регуляторам в селезенке относятся ЛГК, выявляемые как в белой, так и в красной пульпе. В наших экспериментах при обработке срезов с помощью люминесцентно-гистохимических методов было выявлено, что люминесцентная морфология селезенки у крыс контрольной группы исследования имеет типичную картину (рис. 1). В герминативных центрах лимфоидных узелков визуализируются 5–6 крупных ЛГК с яркой желто-белой люминесценцией (рис. 2), расположенные компактно, часто цепочкой на границе с зоной мантии, большая часть из которых при параллельном иммуногистохимическом исследовании дает положительную реакцию на CD68. ЛГК также есть в маргинальной зоне, периаfterиальных лимфоидных муфтах (ПАЛМ) и красной пульпе. Лимфоидные узелки с герминативными центрами, появляющимися после антигенной стимуляции, являются В-зависимыми зонами, а ПАЛМ относятся к Т-зависимым зонам. Выявлено, что в красной пульпе небольшие клетки, расположенные диффузно, экспрессируют CD68, а клетки, локализующиеся группами, дают положительную реакцию на Synaptophysin. И те, и другие клетки также встречаются в области наружной зоны ПАЛМ. Люминесценция ЛГК и паренхимы микроокружения обусловлена содержанием в них биогенных аминов. В лимфоидных узелках и красной пульпе преобладает серотонинергическое обеспечение люминесцирующих клеток, тогда как в ПАЛМ преобладающим амином является гистамин (табл. 1).

В ходе исследования выявлено, что у крыс через 1 месяц после окончания введения канцерогена (на фоне развития дисплазии кишечных крипт в толстой кишке) и у животных контрольной группы селезенка при люминесцентной микроскопии имеет схожую морфологию. Однако в герминативных центрах лимфоидных узелков число ЛГК уменьшается до 4–5 в поле зрения, падает уровень всех биоаминов (табл. 1), при этом соотношение (СТ+ГСТ)/КА в этих клетках возрастает (рис. 3), что указывает на подавление их функциональной активности. Напротив, во всех остальных изучаемых структурах селезенки это

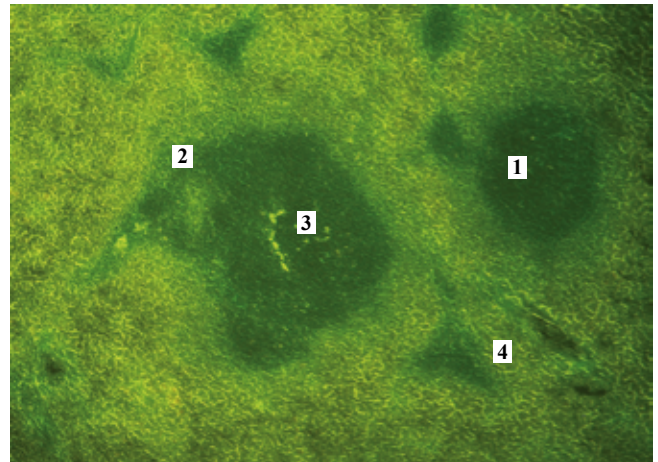


Рис. 1. Селезенка интактной крысы.

1 – лимфоидный узелок, 2 – периаfterиальная лимфоидная муфта, 3 – герминативный центр, 4 – красная пульпа. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа.  $\times 10$

Fig. 1. Spleen of an intact rat.

1 – lymphoid nodule, 2 – periafterial lymphoid sheaths, 3 – germinal center, 4 – red pulp. Luminescent-histochemical Falck-Hillarp method.  $\times 10$

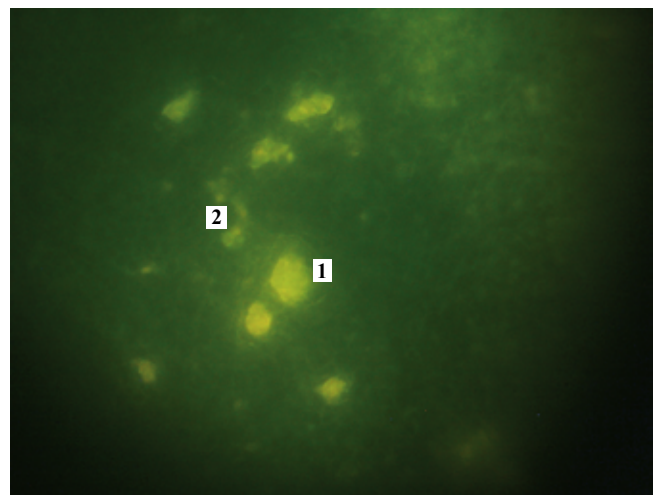


Рис. 2. Герминативный центр селезенки интактной крысы.

1 – яркие люминесцирующие гранулярные клетки с плотными гранулами, 2 – люминесцирующие гранулярные клетки с погасшими гранулами. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа.  $\times 60$

Fig. 2. Germinal center of the spleen of an intact rat.

1 – bright luminescent granular cells with dense granules, 2 – luminescent granular cells with extinguished granules. Luminescent-histochemical Falck-Hillarp method.  $\times 60$

соотношение снижается, что может свидетельствовать о некоторой стимуляции функциональной активности клеток. В люминесцирующих клетках ПАЛМ происходит повышение уровня серотонина и катехоламинов ( $p=0,001$ ), но резко падает содержание гистамина (табл. 1). При этом число CD68<sup>+</sup>- и Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток и в лимфоидных узелках, и в ПАЛМ на этом

Уровень биогенных аминов в люминесцирующих структурах селезенки крыс через 1 и 4 месяца после введения канцерогена | The level of biogenic amines in the luminescent structures of the spleen of rats from the control group, 1 and 4 months after carcinogen introduction

Структуры селезенки   Structures of the spleen	Биогенные амины   Biogenic amines	Контрольная группа   Control group, Me (Q1; Q3)	Канцерогенез   Carcinogenesis	
			через 1 месяц после введения канцерогена   1 month after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)	через 4 месяца после введения канцерогена   4 months after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)
ЛГК <sub>ГЦ</sub>   LGC <sub>GC</sub>	СТ   ST	766 (514,5; 863)	432,5 (289; 546) P=0,000478**	604,5 (432,5; 685,5) P=005497*
	ГСТ   HST	651 (625; 1084)	587,5 (581; 608) P=0,000105**	531,5 (360; 596) P=0,000000... **
	КА   CA	148 (131; 191)	69 (53; 88) P=0,00001**	90 (69; 170) P=0,000002**
М/о ЛГК <sub>ГЦ</sub>   М/е LGC <sub>GC</sub>	СТ   ST	362 (310; 534)	537 (529; 555) P=0,006983*	156 (115; 601) P=0,000012**
	ГСТ   HST	442 (411,5; 705,5)	417,5 (408; 425) P=0,0455	251 (206; 326) P=0,000000... **
	КА   CA	83,5 (76; 143)	112 (107; 116) P=0,1987	45,5 (40; 82) P=0,000000... **
ЛГК <sub>ПАЛМ</sub>   LGC <sub>PALS</sub>	СТ   ST	459 (450; 466)	616 (589; 647) P=0,000280**	783 (752; 810) P=0,000183**
	ГСТ   HST	612,5 (595; 638)	254 (225; 274) P=0,000124**	398 (340; 411) P=0,000183**
	КА   CA	92,5 (89; 95)	187 (169; 198) P=0,000124**	265 (260; 272) P=0,000183**
М/о ЛГК <sub>ПАЛМ</sub>   М/е LGC <sub>PALS</sub>	СТ   ST	599 (594; 604)	207,5 (200; 211) P=0,001376**	184,5 (131,5; 202) P=0,001376**
	ГСТ   HST	334,5 (297,5; 371)	351 (324; 358) P=1,0	351 (326; 362) P=1,0
	КА   CA	47,5 (46; 49)	49 (48; 113) P=0,1025	114 (48; 203) P=0,003855*
ЛГК <sub>КП</sub>   LGC <sub>RP</sub>	СТ   ST	973,5±71,8 751,5 (590; 1165)	677 (660; 692) P=0,3512	404,5 (297,5; 472) P=0,000000... **
	ГСТ   HST	615,5 (463; 858)	458 (454; 463) P=0,006195*	332,5 (288; 415) P=0,000000... **
	КА   CA	148 (140; 288)	209 (203; 387) P=0,0418	70 (56; 82,5) P=0,000000... **
М/о ЛГК <sub>КП</sub>   М/е LGC <sub>RP</sub>	СТ   ST	516 (487; 654)	515 (461; 553) P=0,402	319,5 (188; 435) P=0,000000... **
	ГСТ   HST	535 (500,5; 574)	336,5 (299; 350) P=0,002268*	141,5 (134; 289) P=0,000000... **
	КА   CA	133,5 (106; 165)	202 (192; 272) P=0,082	54,5 (43,5; 64) P=0,000000... **

М/о – микроокружение. Различия по сравнению с группой контроля достоверны при \* – p<0,01 или \*\* – p<0,001

GC – germinal center, RP – red pulp, LGC – luminescent granular cells, М/е – microenvironment, PALS – periarterial lymphoid sheaths, ST – serotonin, HST – histamine, CA – catecholamines. The differences compared to the control group are significant at \* – p<0.01 or \*\* – p<0.001

Таблица 2 | Table 2

Число CD68<sup>+</sup>- и Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток селезенки крыс в контроле, через 1 и 4 месяца после введения канцерогена |  
The number of CD68<sup>+</sup> and Synaptophysin<sup>+</sup> cells of spleen in rats from the control group, 1 and 4 months carcinogen introduction

Клетки селезенки   Cells of the spleen	Контрольная группа   Control group, Me (Q1; Q3)	Канцерогенез   Carcinogenesis	
		через 1 месяц после введения канцерогена   1 month after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)	через 4 месяца после введения канцерогена   4 months after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)
CD68 <sup>+</sup> -клетки КП   CD68 <sup>+</sup> - cells RP	16 (9; 20)	22 (15; 31) p=0,009294*	10 (6; 13) p=0,01402*
CD68 <sup>+</sup> -клетки ГЦ   CD68 <sup>+</sup> - cells GC	8 (6; 12)	6 (4; 8) p=0,0307	5 (3,5; 6) p=0,01429*
CD68 <sup>+</sup> -клетки ПАЛМ   CD68 <sup>+</sup> - cells PALS	16 (13; 23)	13 (9; 19,5) p=0,0657	11 (7; 12) p=0,003614*
Synaptophysin <sup>+</sup> -клетки КП   Synaptophysin <sup>+</sup> - cells RP	31 (11; 40)	57 (30; 69) p=0,002195*	79 (58,5; 82,5) p=0,00...**
Synaptophysin <sup>+</sup> -клетки ГЦ   Synaptophysin <sup>+</sup> - cells GC	10 (9; 11)	14 (13; 15) p=0,0828	15,5 (13,5; 17) p=0,0864
Synaptophysin <sup>+</sup> -клетки ПАЛМ   Synaptophysin <sup>+</sup> - cells PALS	16,5 (15; 30)	22 (15; 30) p=0,2297	19 (16; 24) p=0,3565

Различия по сравнению с группой контроля достоверны при \* – p<0,01 или \*\* – p<0,001

GC – germinal center, RP – red pulp, LGC – luminescent granular cells, M/e – microenvironment, PALS – periarterial lymphoid sheaths, ST – serotonin, HST – histamine, CA – catecholamines.

The differences compared to the control group are significant at \* – p<0.01 or \*\* – p<0.001

сроке наблюдения (1 месяц после окончания введения канцерогена) изменяется недостоверно (табл. 2).

В красной пульпе на этом сроке наблюдения численность ЛГК увеличивается, но в них снижаются серотониновая и гистаминовая обеспеченность (табл. 1) и биоаминное соотношение. Число Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток в этой зоне возрастает в 1,8 раза, p=0,01, при этом в 1,5 раза увеличивается (p=0,01) число CD68<sup>+</sup> макрофагов (табл. 2).

На более поздних сроках, то есть через 4 месяца после окончания введения канцерогена (на фоне роста аденокарциномы в толстой кишке), в лимфоидных

узлах селезенки отмечается сокращение числа ЛГК до 2–3 в поле зрения, клетки располагаются диффузно, отсутствует характерная цепочка из клеток. При этом происходит перераспределение биогенных аминов в белой пульпе: резко падает их уровень в спленоцитах микроокружения ЛГК герминативных центров, хотя в самих ЛГК их содержание по сравнению с начальным периодом канцерогенеза незначительно увеличивается, а соотношение (СТ+ГСТ)/КА остается на уровне контрольных значений (рис. 3). В то же время в ПАЛМ на фоне более значимого роста катехоламиновой обеспеченности люминесцентных

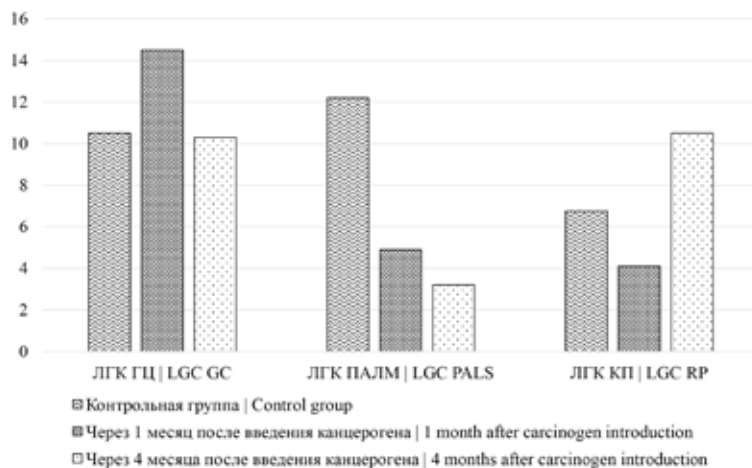


Рис. 3. Изменение соотношения (СТ+ГСТ)/КА в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК) красной пульпы (ЛГК КП), герминативных центров лимфоидных узлов (ЛГК ГЦ), периаартериальных лимфоидных муфт (ЛГК ПАЛМ) селезенки крыс в контрольной группе, через 1 и 4 месяца после введения канцерогена

Fig. 3. Changes in the ratio (ST+HST)/CA of the luminescent granular cells of the red pulp (LGC RP), germinal centers of lymphoid nodules (LGC GC), and periarterial lymphoid sheaths (LGC PALS) of the rat spleen in the control group, 1 and 4 months after carcinogen introduction

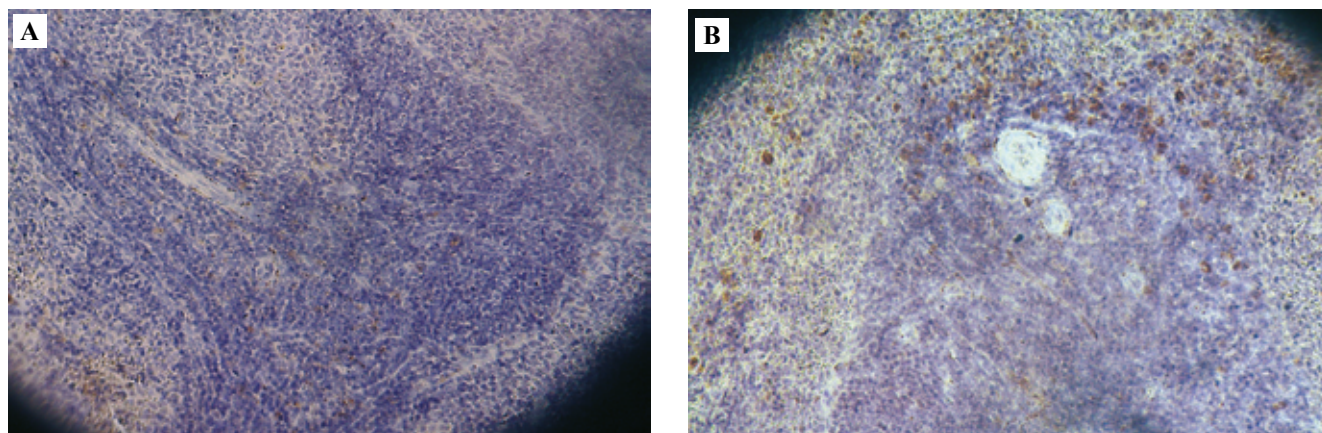


Рис. 4. Synaptophysin<sup>+</sup> клетки в селезенке крысы.

А – контроль. В – увеличение численности иммунопозитивных клеток в красной пульпе через 4 месяца после введения канцерогена. ИГХ реакция с антителами к Synaptophysin, ×40

Fig. 4. Synaptophysin<sup>+</sup> cells in the rat spleen.

A – control group. B – increased number of the immunopositive cells in the red pulp 4 months after carcinogen introduction. IHC assay with Synaptophysin, ×40

клеток и их микроокружения (увеличение уровня КА в 3 раза,  $p=0,001$ ) значительно снижается соотношение (СТ+ГСТ)/КА. Число CD68<sup>+</sup>-клеток уменьшается ( $p=0,01$ ) во всех исследуемых зонах селезенки (табл. 2). Количество Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток в белой пульпе не изменяется, но в красной пульпе нарастает еще больше по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, превышая контрольные значения в 2,6 раза,  $p=0,001$  (рис. 4). Это сопровождается выраженным падением уровня биогенных аминов и значительным ростом показателя (СТ+ГСТ)/КА как в люминесцирующих клетках красной пульпы, так и их микроокружении (рис. 3).

## Обсуждение

Влияние функциональной активности клеток селезенки на индукцию и рост опухолей, по данным разных авторов, носит противоречивый характер. Имеются сведения как о стимуляции, так и о торможении онкогенеза в результате спленэктомии [14, 18–20]. Именно селезенка является основным источником клеток микроокружения опухоли. К таким клеткам относятся опухольассоциированные макрофаги и опухольинфильтрирующие дендритные клетки, способные влиять на рост, прогрессирование и метастазирование опухоли [11, 21]. Наши исследования показали, что выявляемые люминесцентно-гистохимическими методами биоаминсодержащие люминесцирующие гранулярные клетки реагируют на развитие опухоли изменением численности, уровня и соотношения биогенных аминов, что, вероятно, свидетельствует об их участии в межклеточных взаимодействиях при регуляции процессов канцерогенеза. Из литературы известно, что среди ЛГК присутствуют макрофаги, дендритные и нейроэндокринные клетки APUD-системы [17].

Нейротрансмиттеры, в том числе биологически активные амины, продуцируемые этими клетками,

в частности серотонин, дофамин, адреналин, гистамин, выступают как посредники в межклеточных взаимодействиях в ходе иммунного реагирования на различные антигены, в том числе опухолевые [5]. В зависимости от этиологического фактора разные амины могут выступать и в качестве активаторов, и в качестве ингибиторов клеточной пролиферации. Известно, что серотонин способен активировать фагоцитоз, стимулировать цитотоксичность NK-клеток, влиять на продукцию цитокинов и усиливать миграцию клеток [5, 22]. Гистамин тормозит дегрануляцию тучных клеток и способен угнетать выработку макрофагами компонентов комплемента, тем самым может выступать как антагонист иммунного реагирования. В то же время имеются сведения, что гистамин способен усиливать цитотоксичность Т-лимфоцитов и NK-клеток, стимулируя тем самым клеточный иммунный ответ [23]. Содержание катехоламинов после антигенной стимуляции увеличивается в лимфоцитах через сигнальные пути, инициируемые протеинкиназой С, играющей ключевую роль в активации Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток и фагоцитов [3, 8]. Наблюдаемые нами на этапе предопухолевых процессов в толстой кишке изменения уровней биоаминов и снижение соотношения (СТ+ГСТ)/КА как в ЛГК ПАЛМ селезенки, так и в паренхиме их микроокружения свидетельствуют о некоторой активации иммунологической реактивности клеток Т-зависимых зон селезенки на начальных стадиях канцерогенеза. Такая реакция клеток Т-зависимой зоны на предопухолевые изменения в толстой кишке может быть следствием того, что в тимусе на этом сроке наблюдаются признаки первой фазы акцидентальной инволюции [24]. Выявленные изменения в белой пульпе сопровождаются уменьшением диаметра лимфоидных узелков и их герминативных центров, уменьшением процента CD79a<sup>+</sup>-клеток (В-лимфоциты) и увеличением числа

S100<sup>+</sup> дендритных клеток через 1 месяц после окончания введения 1,2-диметилгидразина, показанным в наших предыдущих работах [12, 13]. Вероятно, суммарно направленное действие биогенных аминов ЛГК в герминативном центре приводит к уменьшению числа пролиферирующих клеток, в результате чего уменьшается и численность В-лимфоцитов. Рост численности Synaptophysin<sup>+</sup>-клеток в красной пульпе селезенки, наблюдаемый нами уже на этапе предопухолевых изменений в толстой кишке, может свидетельствовать об активном участии этих клеток APUD-системы в реакции иммунной системы на канцерогенез [3, 7].

Через 4 месяца после введения канцерогена наиболее значимые изменения в биоаминном обеспечении мы наблюдали в ПАЛМ, где при 3-кратном повышении содержания катехоламинов отмечалось падение соотношения (СТ+ГСТ)/КА. Это происходит на фоне уменьшения ширины ПАЛМ и числа Т-лимфоцитов, показанного в нашей предыдущей работе [12], что, вероятно, обусловлено процессами акцидентальной инволюции тимуса, вызванной введением 1,2-диметилгидразина. Выявлено, что в тимусе при этом также изменяется численность ЛГК, отмечается дисбаланс уровней биогенных аминов, возрастает экспрессия синаптофизина [24]. На модели опухоли у мышей, индуцированной диметилбензантраценом, обнаружено уменьшение числа и активности кортикальных тимоцитов с параллельным увеличением числа спленоцитов, при этом активность селезеночных Т-лимфоцитов снижалась [25]. W. Jiang et al. на модели подкожной гепатомы у мышей выявили уменьшение числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и возрастание числа макрофагов в селезенке на 21-й день после инокуляции опухолевых клеток [26]. Наблюдаемое нами уменьшение числа CD68<sup>+</sup>-клеток во всех исследуемых зонах селезенки через 4 месяца после введения канцерогена может быть связано с усиленной миграцией макрофагов селезенки в растущую опухоль [11], тем более что экспрессия CD68 всегда обнаруживается в клетках стромы колоректальной раковой опухоли [21], а продолжающееся нарастание экспрессии синаптофизина на этапе роста аденокарциномы в толстой кишке свидетельствует об усилении нейроэндокринного влияния при канцерогенезе.

### Заключение

В ходе эксперимента было выявлено, что на фоне роста опухоли толстой кишки на этапе дисплазии в селезенке выявляются снижение функциональной активности биоаминсодержащих клеток герминативных центров лимфоидных узелков (В-зависимых зон) и некоторая активация биоаминсодержащих клеток периартериальных лимфоидных муфт (Т-зависимых зон). При этом наиболее выраженная реакция на начало онкогенеза наблюдается в красной пульпе, где на фоне увеличения численности CD68<sup>+</sup>-макрофагов возрастает и функциональная активность клеток. На этапе разви-

тия аденокарциномы на фоне развития акцидентальной инволюции тимуса напряжение Т-клеточного звена возрастает еще больше, а число макрофагов снижается во всех изучаемых компартментах селезенки. Следует отметить, что важную роль в реакции селезенки на развитие опухоли играют Synaptophysin<sup>+</sup> нейроэндокринные клетки красной пульпы, численность которых в динамике возрастает. При этом непосредственное участие в процессах взаимодействия клеток селезенки между собой и с опухольассоциированными клетками принимают биогенные амины.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Ю. Стручко,

Л.М. Меркулова.

Сбор и обработка материала – О.М. Арлашкина, М.Н. Михайлова.

Написание текста – М.Н. Михайлова, О.М. Арлашкина.

Редактирование – Л.М. Меркулова, И.С. Стоменская,

О.Ю. Кострова.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.Yu. Struchko,

L.M. Merkulova.

Collected the data and performed the analysis – O.M. Arlashkina,

M.N. Mikhailova.

Wrote the paper – M.N. Mikhailova, O.M. Arlashkina.

Edited the manuscript – L.M. Merkulova, I.S. Stomenskaya,

O.Yu. Kostrova.

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

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

### Литература/References

1. Colorectum fact sheet. International Agency for Research on Cancer (IARC). Available from: [http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf) (accessed 04.08.2022).
2. Thangaraj K, Natesan K, Settu K, Palani M, Govindarasu M, Subborayan V et al. Orientin mitigates 1, 2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation, antioxidant and biotransforming bacterial enzyme alterations in experimental rats. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(6):1379–88. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT\_1363\_16.
3. Самотруева М.А., Ясенявская А.Л., Цибизова А.А., Башкина О.А., Галимзянов Х.М., Тюренков И.Н. Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах. *Иммунология.* 2017;38(1):49–59. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-1-49-59. Samotrueva MA, Yasenyavskaya AL, Tsbizova AA, Bashkina OA, Galimzyanov HM, Tyurenkov IN. Neuroimmunoenocrinology: modern concepts of molecular mechanisms. *Immunology.* 2017;38(1):49–59 (In Russ.). DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-1-49-59.
4. Парахонский А.П. Молекулярно-биологические аспекты изучения нейроэндокринных механизмов регуляции функционирования иммунной системы. *Заметки ученого.* 2018;4(29):21–29. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35396340> (получено 04.08.2022). Parakhonsky AP. Molecular biological aspects of the neuroendocrine mechanisms of regulation functioning of the immune

- system. *Zametki uchenogo (Scholar's Notes)*. 2018;4(29):21–29 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35396340> (accessed 04.08.2022).
5. *Capellino S, Claus M, Watzl C*. Regulation of natural killer cell activity by glucocorticoids, serotonin, dopamine, and epinephrine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(7):705–11. DOI: 10.1038/s41423-020-0477-9.
  6. *Murray K, Barboza M, Rude KM, Brust-Mascher I, Reardon C*. Functional circuitry of neuro-immune communication in the mesenteric lymph node and spleen. *Brain Behav Immun*. 2019;82:214–23. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.08.188.
  7. *Shimojo G, Joseph B, Shah R, Consolim-Colombo FM, De Angelis K, Ulloa L*. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2019;75:181–91. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.10.005.
  8. *Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G*. Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: Open questions. *Trends Immunol*. 2003;24(11):581–2. DOI: 10.1016/j.it.2003.09.002.
  9. *Суходоло И.В., Геренг Е.А.* Структурно-функциональная организация клеток диффузной эндокринной системы в дыхательных путях в норме и патологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008;7(1):71–75. DOI: 10.20538/1682-0363-2008-1-71-75.  
*Sukhodolo IV, Gereng YeA*. The structurally functional organization of cells in respiratory ways to norm and at a pathology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2008;7(1):71–75 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2008-1-71-75.
  10. *Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов – синаптофизин. *Морфология*. 2015;147(1):78–82. DOI: 10.17816/morph.398838.  
*Kolos YeA, Grigoriyev IP, Korzhevskiy DE*. A synaptic marker synaptophysin. *Morfologiya*. 2015;147(1):78–82 (In Russ.). DOI: 10.17816/morph.398838.
  11. *Андрюхова Е.С., Таширева Л.А., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М.* Макрофаги селезенки: особенности популяционного состава и функции. *Цитология*. 2022;64(1):14–25. DOI: 10.31857/S0041377122010023.  
*Andryukhova ES, Tashireva LA, Vtorushin SV, Zavyalova MV, Perelmuter VM*. Spleen macrophages: Features of population composition and function. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*. 2022;64(1):14–25 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377122010023.
  12. *Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Арлашкина О.М., Михайлова М.Н.* Морфологические изменения селезенки в условиях экспериментального канцерогенеза. *Acta medica Eurasica*. 2016;3:54–58. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/wmiehl> (получено 04.08.2022).  
*Merkulova L, Struchko G, Arlashkina O, Mikhailova M*. Morphological changes of the lien in the conditions of the experimental carcinogenesis. *Acta Medica Eurasica*. 2016;3:54–58 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/wmiehl> (accessed 04.08.2022).
  13. *Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезенки при экспериментальном канцерогенезе. *Иммунология*. 2019;40(2):17–22. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-12003.  
*Arlashkina OM, Struchko GYu, Merkulova LM, Mikhailova MN*. Morphological characteristics of white pulp and spleen dendritic cells at the experimental carcinogenesis. *Immunology*. 2019;40(2):17–22 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-12003.
  14. *Lisnychuk N, Soroka Y, Andriychuk I, Nebesna Z, Volkov K*. Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. *Georgian Med News*. 2018;280–281:160–4. PMID: 30204117.
  15. *Regh JE, Bush D, Ward JM*. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol*. 2012;40(2):345–74. DOI: 10.1177/0192623311430695.
  16. *Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* Реакция CD68<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> и катехоламинсодержащих клеток селезенки на развитие опухоли в толстой кишке у потомства спленэктомизированных крыс-самок. *Цитология*. 2021;63(5):474–482. DOI: 10.31857/S0041377121050023.  
*Arlashkina OM, Struchko GYu, Merkulova LM, Mikhailova MN*. Reaction of CD68<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, and Catecholamine-Containing Spleen Cells to the Development of a Colon Tumor in the Offspring of Splenectomized Rat Females. *Cell and Tissue Biology*. 2021;63(5):474–482 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377121050023
  17. *Любовцева Л.А., Ефремова О.А., Голубцова Н.Н., Руссов А.В., Шамитова Е.Н., Леонова Л.К. и др.* Свойства гранулярных люминесцирующих клеток. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2009;11(1):25a–26. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12959971> (получено 04.08.2022).  
*Lubovtseva LA, Efremova OA, Golubtsova NN, Russov AV, Shamitova EN, Leonova LK et al*. Properties of the granular luminescent cells. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2009;11(1):25a–26 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12959971> (accessed 04.08.2022).
  18. *Higashijima J, Shimada M, Chikakiyo M, Miyatani T, Yoshikawa K, Nishioka M et al*. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice. *Anticancer Res*. 2009;29(1):385–93. PMID: 19331177.
  19. *Stöth M, Freire Valls A, Chen M, Hidding S, Knipper K, Shen Y et al*. Splenectomy reduces lung metastases and tumoral and metastatic niche inflammation. *Int J Cancer*. 2019;145(9):2509–20. DOI: 10.1002/ijc.32378.
  20. *Steenbrugge J, De Jaeghere EA, Meyer E, Denys H, De Wever O*. Splenic hematopoietic and stromal cells in cancer progression. *Cancer Res*. 2021;81(1):27–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2339.
  21. *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, Gratchev 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.
22. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:48. DOI: 10.3389/fcvm.2017.000480.
23. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9524075. DOI: 10.1155/2018/9524075.
24. Struchko GY, Merkulova LM, Moskvichev EV, Kostrova OY, Mikhailova MN, Drandrova EG. Morphological and immunohistochemical features of thymus in the presence of colon cancer. *The New Armenian Medical Journal.* 2015;9(2):60–67. Available from: <https://ysmu.am/website/documentation/files/72f503a7.pdf> (accessed 04.08.2022).
25. Дубинина Н.В. Изменение функциональной активности Т-лимфоцитов селезенки на фоне химического канцерогенеза. *Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии.* 2013;4(118):56–62. Доступно по адресу: [http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4\\_118/56-62.pdf](http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4_118/56-62.pdf) (получено 04.08.2022).  
*Dubinina NV.* Changes in functional activity of T lymphocytes of spleen on the background of chemical carcinogenesis. *Problems of Ecological and Medical Genetics and Clinical Immunology.* 2013;4(118):56–62 (In Russ.). Available from: [http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4\\_118/56-62.pdf](http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4_118/56-62.pdf) (accessed 04.08.2022).
26. Jiang W, Li Y, Zhang S, Kong G, Li Z. Association between cellular immune response and spleen weight in mice with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2021;22(2):625. DOI: 10.3892/ol.2021.12886.

### Информация об авторах

Марина Николаевна Михайлова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ольга Михайловна Арлашкина – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Глеб Юрьевич Стручко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Лариса Михайловна Меркулова – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ирина Станиславовна Стоменская – кандидат медицинских наук, доцент кафедры инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ольга Юрьевна Кострова – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

### Author information

Marina N. Mikhailova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-6957-940X>

Olga M. Arlashkina – Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

Gleb Yu. Struchko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of the Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<https://orcid.org/0000-0002-0549-5116>

Larisa M. Merkulova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of the Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7460-6791>

Irina S. Stomenskaya – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of the Instrumental Diagnostics with Phthysiology Course, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7332-4477>

Olga Yu. Kostrova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of the Instrumental Diagnostics with Phthysiology Course, IN Ulyanov Chuvash State University.  
<https://orcid.org/0000-0002-7057-9834>

## Морфологическая характеристика внутренних органов мышей при длительном потреблении микропластика

Н.А. Золотова, Д.Ш. Джалилова, И.С. Цветков, А.В. Сентябрева, О.В. Макарова

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Микропластик, загрязняющий окружающую среду, может представлять опасность для здоровья живых организмов, в том числе человека. Экспериментальные исследования на мышцах и крысах показали, что микропластик способен проникать во внутреннюю среду организма, вызывать структурные повреждения и нарушения функции различных органов. Тем не менее данные, посвященные этой проблеме, фрагментарны и противоречивы. Цель работы – охарактеризовать морфологические изменения внутренних органов мышей при длительном потреблении разных доз микропластика.

**Материалы и методы.** Мышам трех опытных групп (пять мышей в каждой группе) в течение 4 недель питьевую воду заменяли на суспензию частиц полистирола диаметром 5 мкм в дистиллированной воде с концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/л. Средние дозы потребления составили 0,023, 0,23 и 2,3 мг микропластика на килограмм массы тела животного в сутки, соответственно. Животные контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали дистиллированную воду. Проводили морфологическое исследование толстой кишки, селезенки, печени, почек, легких, тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, головного мозга, сердца, семенников и мышцы бедра. В ободочной кишке морфометрическими методами были оценены воспалительная инфильтрация, число эндокринных и бокаловидных клеток и содержание в последних нейтральных и высокосульфатированных муцинов.

**Результаты.** Патологических изменений в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра мышей при воздействии разных доз частиц полистирола диаметром 5 мкм не выявлено. При низкой дозе микропластика (0,023 мг/кг/сут) обнаружено снижение объемной доли бокаловидных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки. При высокой концентрации микропластика (2,3 мг/кг/сут) наблюдались активация морфофункциональных зон селезенки, а также повышение содержания эндокринных клеток и снижение доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках.

**Заключение.** Микропластики полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023–2,3 мг/кг/сут при воздействии в течение 4 недель вызывают адаптивные морфофункциональные изменения в толстой кишке и селезенке.

**Ключевые слова:** микропластик, полистирол, селезенка, ободочная кишка, внутренние органы

**Для корреспонденции:** Наталья Александровна Золотова. E-mail: natashazltv@gmail.com

**Для цитирования:** Золотова Н.А., Джалилова Д.Ш., Цветков И.С., Сентябрева А.В., Макарова О.В. Морфологическая характеристика внутренних органов мышей при длительном потреблении микропластика. Клин. эксп. морфология. 2023;12(3):82–92. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.3.82-92.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-00232.

Статья поступила 30.11.2022. Получена после рецензирования 22.12.2022. Принята в печать 10.04.2023.

## Morphological features of the internal organs in mice after prolonged microplastics consumption

N.A. Zolotova, D.Sh. Dzhaliilova, I.S. Tsvetkov, A.V. Sentyabreva, O.V. Makarova

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Microplastics (MP) pollute the environment and can pose a danger to living organisms including humans. Experimental studies on mice and rats demonstrated that microplastics can enter the internal environment, causing structural damage to and dysfunction of various organs. However, data

on this issue are scarce and contradictory. The aim of this paper was to characterize morphological changes in the internal organs in mice after prolonged MP consumption in different doses.

**Materials and methods.** We formed four groups (n=5 each): three experimental and one control group. Mice of the experimental groups were given a 5- $\mu$ m polystyrene particle suspension in distilled water at a concentration of 0.1, 1, and 10 mg/l for 4 weeks. The daily consumption doses averaged 0.023, 0.23, and 2.3 mg of microparticles per kg of animal body weight, respectively. The control group received distilled water throughout the experiment. We conducted a morphological examination of the colon, spleen, liver, kidneys, lungs, thymus, mesenteric lymph nodes, brain, heart, testicles, and thigh muscles. In the colon, morphometric methods were used to evaluate inflammatory infiltration, the number of endocrine and goblet cells, and the content of neutral and highly sulfated mucins in the latter.

**Results.** On morphological examination under the influence of 5- $\mu$ m polystyrene particle consumption in different doses, we revealed pathological changes only in the spleen and colon. However, a decrease in the goblet cell volume fraction in the colon mucosa was found in the group with low dose of microplastics (0.023 mg/kg/day). The group that consumed 2.3 mg/kg/day of microplastics showed the activation of both spleen compartments, an increased endocrine cells count, and a decreased proportion of highly sulfated mucins in goblet cells.

**Conclusion.** Polystyrene microparticles with a 5- $\mu$ m diameter consumed for 4 weeks at doses of 0.023–2.3 mg/kg/day cause adaptive morphological and functional changes in the colon and spleen.

**Keywords:** microplastics, polystyrene, spleen, colon, internal organs

**Corresponding author:** Natalia A. Zolotova. E-mail: natashazltv@gmail.com

**For citation:** Zolotova N.A., Dzhaililova D.Sh., Tsvetkov I.S., Sentyabreva A.V., Makarova O.V. Morphological features of the internal organs in mice after prolonged microplastics consumption. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):82–92 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.82-92.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-24-00232.

**Received** 30.11.2022. **Received in revised form** 22.12.2022. **Accepted** 10.04.2023.

## Введение

Термин «пластмассы» или «пластики» обозначает любые материалы, основой которых являются синтетические либо природные высокомолекулярные соединения – полимеры. За последние 60 лет во всем мире произведено более 6,3 млрд тонн различных пластмасс [1]. Пластиковый мусор в окружающей среде очень медленно разлагается, но быстро распадается на мелкие фрагменты. Пластиковые фрагменты размером менее 5 мм получили название «микропластик» (МП). За счет малых размеров частиц МП интенсивно распространяется в окружающей среде с водой и ветром и обнаруживается по всему земному шару: в воздухе, почве и воде, в полярных льдах, на глубине морей, в живых организмах. Человек постоянно поглощает МП с водой и пищей, вдыхает с воздухом [2], поэтому основной вопрос в проблеме загрязнения среды МП заключается в том, представляет ли он риск для здоровья человека. Тем не менее однозначного ответа на этот вопрос до сих пор нет.

Наиболее часто для оценки токсических и нетоксических эффектов различных веществ на организм человека в качестве модельных животных используют лабораторных грызунов. Исследований эффектов МП на организм лабораторных грызунов на данный момент проведено относительно немного: к сентябрю 2021 года было опубликовано всего 30 статей [2]. На 1 ноября 2022 года в базе данных PubMed по запросу *microplastic+mice* отображается 160 работ. В большинстве случаев для моделирования эффектов длитель-

ного потребления МП микрочастицы пластика вводят мышам перорально с водой через желудочный зонд или заменяют воду в поилках на суспензию МП. Чаще всего используются частицы полистирола диаметром 0,5 или 5 мкм. Полистирол (PS) – один из наиболее распространенных типов пластика, из него изготавливают одноразовую посуду и упаковочные материалы, строительные материалы – такие как сэндвич-панели, теплоизоляционные плиты, декоративные элементы, пленки; медицинское оборудование, включая одноразовые инструменты и различные детали устройств для переливания крови, и т.д. Дозы при пероральном воздействии варьируют от 0,01 до 100 мг/кг/сут, чаще всего составляют 0,024 и 0,24 мг/кг/сут. При пероральном введении лабораторным грызунам частицы МП были обнаружены в кишечнике, печени, почках, легких, селезенке, сердце, яичниках и семенниках, что вызывало биохимические изменения, структурные повреждения и дисфункцию этих органов [2, 3]. Однако из-за небольшого числа исследований и значительных различий в выборе видов и линий животных, доз, типов и размеров частиц МП, способов его введения, продолжительности воздействия данные о потенциальном вреде пластика для человека и животных фрагментарны и противоречивы.

В связи с изложенным целью работы – охарактеризовать морфологические изменения внутренних органов мышей при потреблении частиц микропластика в течение 4 недель в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг на килограмм массы тела в сутки.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на 20 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая». Мышей содержали в открытой системе при температуре +18–25°C при естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», Россия, сертификат соответствия № РОССТУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено биоэтической комиссией НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына (протокол № 31(7) от 03.12.2021).

Животных разделили на четыре группы по пять мышей в каждой. В трех опытных группах воду в поилках на 4 недели заменяли на суспензию микрочастиц полистирола диаметром 5 мкм (Micro particles based on polystyrene, superparamagnetic, orange fluorescent size: 5 µm, 49831, Sigma-Aldrich, США) в дистиллированной воде, концентрация МП – 0,1, 1 и 10 мг/л. Средняя масса тела мышей составляла 22,0±2,5 грамма, каждое животное потребляло около 5 мл суспензии частиц МП в день. Соответственно, в среднем дозы составляли 0,023, 0,23 и 2,3 мг МП на килограмм массы тела животного в сутки. Суспензию частиц готовили ежедневно, жидкость в поилках взбалтывали несколько раз в день. Мыши контрольной группы на протяжении всего эксперимента потребляли дистиллированную воду. Животных выводили из эксперимента на 29-е сутки методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Проводили аутопсию животных, забирали внутренние органы и четырехглавую мышцу бедра. Дистальный отдел ободочной кишки вскрывали по брыжейке, промывали фосфатно-солевым буфером (Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4, 0.01M, таблетки, «БиолоТ», Россия), расправляли на миллипоровом фильтре, фиксировали в 10% забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение суток. Печень, почку, селезенку, тимус, брыжеечные лимфатические узлы, головной мозг, сердце, мышцу бедра и семенник фиксировали в жидкости Буэна в течение суток, а легкие – в фиксаторе Карнуа в течение 4 часов. После гистологической проводки в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США) образцы тканей заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Fisher Scientific, США). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили морфологическое исследование препаратов.

Для оценки количества клеток в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки окрашенные гематоксилином и эозином препараты фотографировали при ×400 на микроскопе AxioPlan 2 imaging (Carl Zeiss, Германия). В программе PhotoM 1.21 (© А. Черниговский, 2000–2001) измеряли

площадь соединительной ткани СПСО, подсчитывали число ядер, попавших в эту зону. Рассчитывали число клеточных элементов на стандартную единицу площади СПСО (1 мкм<sup>2</sup>).

Для оценки объемной доли бокаловидных клеток в слизистой оболочке толстой кишки и содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов гистологические препараты окрашивали альциановым синим pH 1,0 и проводили ШИК-реакцию. Препараты фотографировали при ×200 в одинаковых условиях освещения. В программе ImageJ (National Institute of Health, США) проводили бинаризацию снимков препаратов с ШИК-реакцией, устанавливая порог так, чтобы выделенными оказывались только бокаловидные клетки. Обводили участок с правильно ориентированными криптами от мышечной пластинки до просвета, определяли его площадь и площадь бокаловидных клеток на нем. Рассчитывали объемную долю бокаловидных клеток как отношение площади бокаловидных клеток к площади слизистой оболочки. На снимках препаратов, окрашенных альциановым синим, и после проведения ШИК-реакции в программе ImageJ измеряли среднюю яркость точек бокаловидных клеток и фона – участка снимка без ткани. Рассчитывали оптическую плотность бокаловидных клеток как десятичный логарифм отношения средней яркости точек фона к средней яркости точек бокаловидных клеток.

Для оценки числа эндокринных клеток в ободочной кишке проводили иммунофлуоресцентное исследование гистологических срезов с антителами к хромогранину А (Rabbit-anti-mouse polyclonal anti-Chromogranin A antibody, ab15160, Abcam, Великобритания, разведение 1:200). Использовали вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor™ 488 (A11008, Invitrogen, разведение 1:300) [4, 5]. Препараты фотографировали при ×100. В программе PhotoM 1.21 измеряли площадь участка слизистой оболочки с правильно ориентированными криптами. Подсчитывали число клеток с флуоресцентной меткой на выделенном участке. Рассчитывали число хромогранин А-положительных клеток на 1 мкм<sup>2</sup> площади слизистой оболочки.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса в сочетании со множественным сравнением средних рангов. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

## Результаты

При морфологическом исследовании в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра мышей контрольной группы и получавших

суспензию разных доз МП какие-либо патологические изменения не выявлены.

В опытных группах по сравнению с контрольной обнаружены морфологические изменения в селезенке и дистальном отделе ободочной кишки. В группе животных, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут, в селезенке наблюдались расширение светлых центров лимфоидных узелков и расширение маргинальных зон, что указывает на антигенную активацию (рис. 1). По сравнению с контрольной у животных всех опытных групп на качественном уровне в дистальном отделе ободочной кишки отмечались увеличение размеров и снижение количества бокаловидных клеток (рис. 2 А–D).

При исследовании печени, почек, легких, тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, головного мозга, сердца, семенников и мышцы бедра не было обнаружено различий между опытными и контрольной группами.

Так как при качественном морфологическом исследовании были выявлены структурные изменения в обо-

дочной кишке, проведено морфометрическое исследование этого органа. При оценке содержания клеточных элементов в СПСО ободочной кишки статистически значимые различия между контрольной и опытными группами не выявлены (рис. 2 Е).

Эндокринные клетки выявляли с помощью антител к компоненту секреторных гранул – хромогранину А. В группах мышей, потреблявших МП в дозах 0,023 и 0,23 мг/кг/сут, содержание хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки не отличалось от контрольных значений. В группе 2,3 мг/кг/сут этот показатель статистически значимо возрастал (рис. 3).

По сравнению с контролем во всех экспериментальных группах отмечалась выраженная тенденция к снижению объемной доли бокаловидных клеток, однако статистической значимости различия достигали только в группе животных, потреблявших МП в дозе 0,023 мг/кг/сут. Содержание в бокаловидных клетках нейтральных и высокосульфатированных

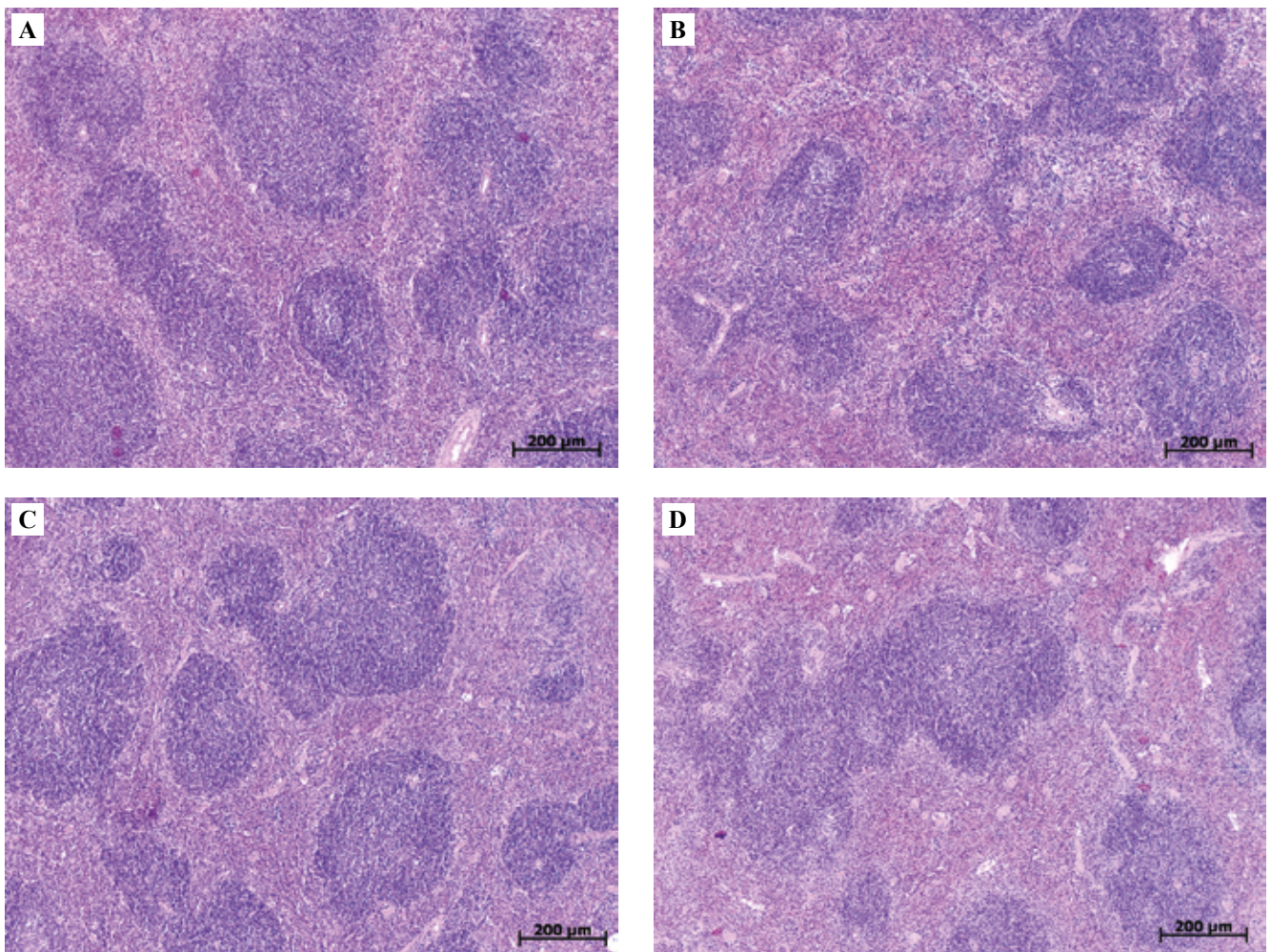


Рис. 1. Селезенка мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 200 мкм

Fig. 1. Spleens of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 mg/kg/day (D). H&E stain, scale bar 200 µm

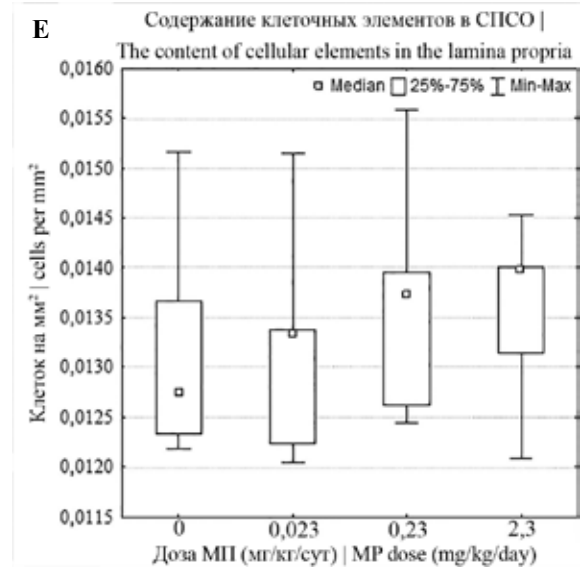
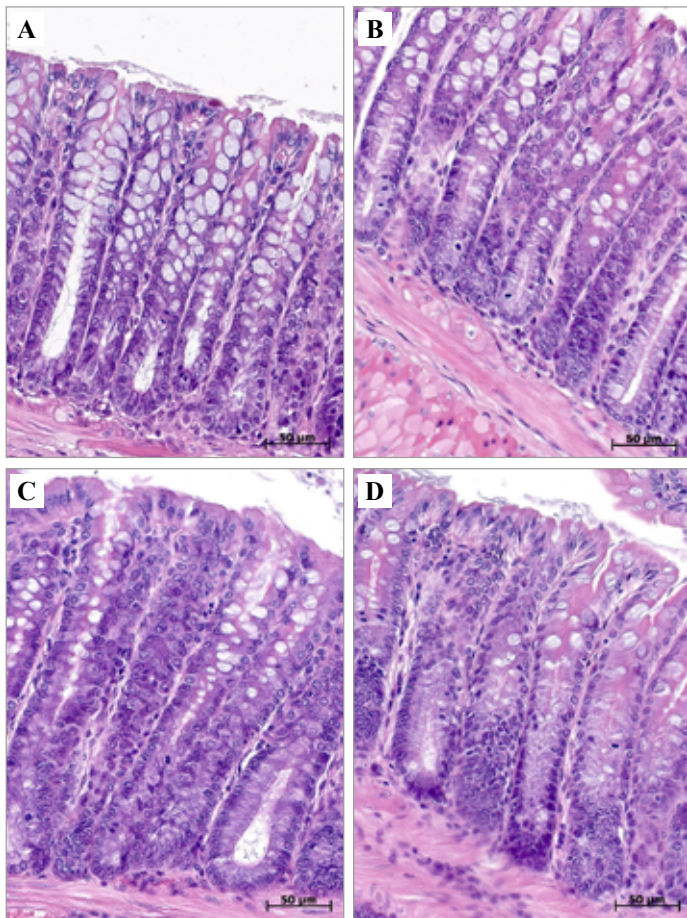


Рис. 2. Слизистая оболочка дистального отдела ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 50 мкм. Е – содержание клеточных элементов в СПСО ободочной кишки

Fig. 2. The mucosa of the distal colon of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics (MP) at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 (D) mg/kg/day. H&E stain, scale bar 50 µm. E – the content of cellular elements in the lamina propria of the colon

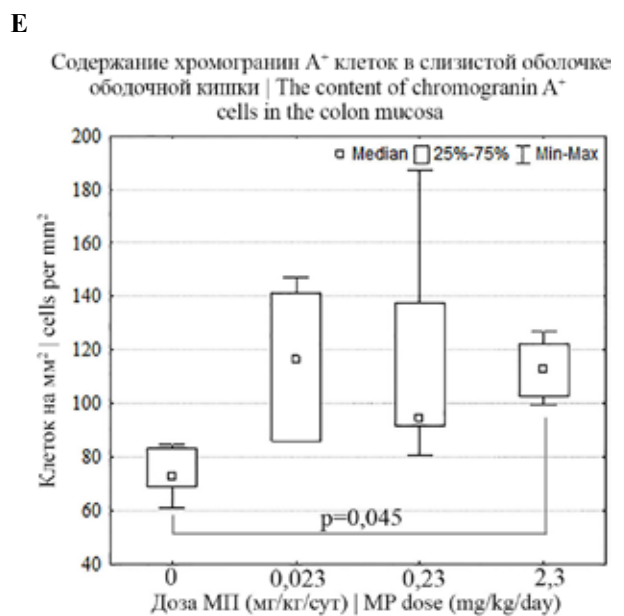
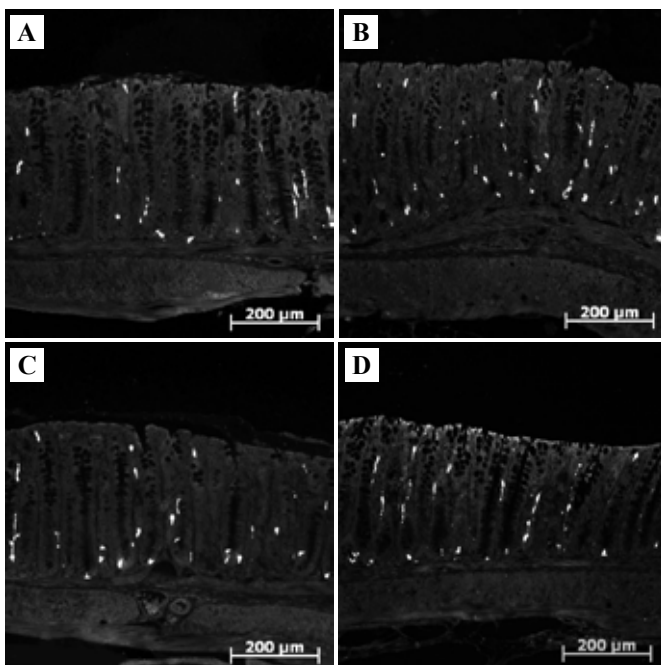
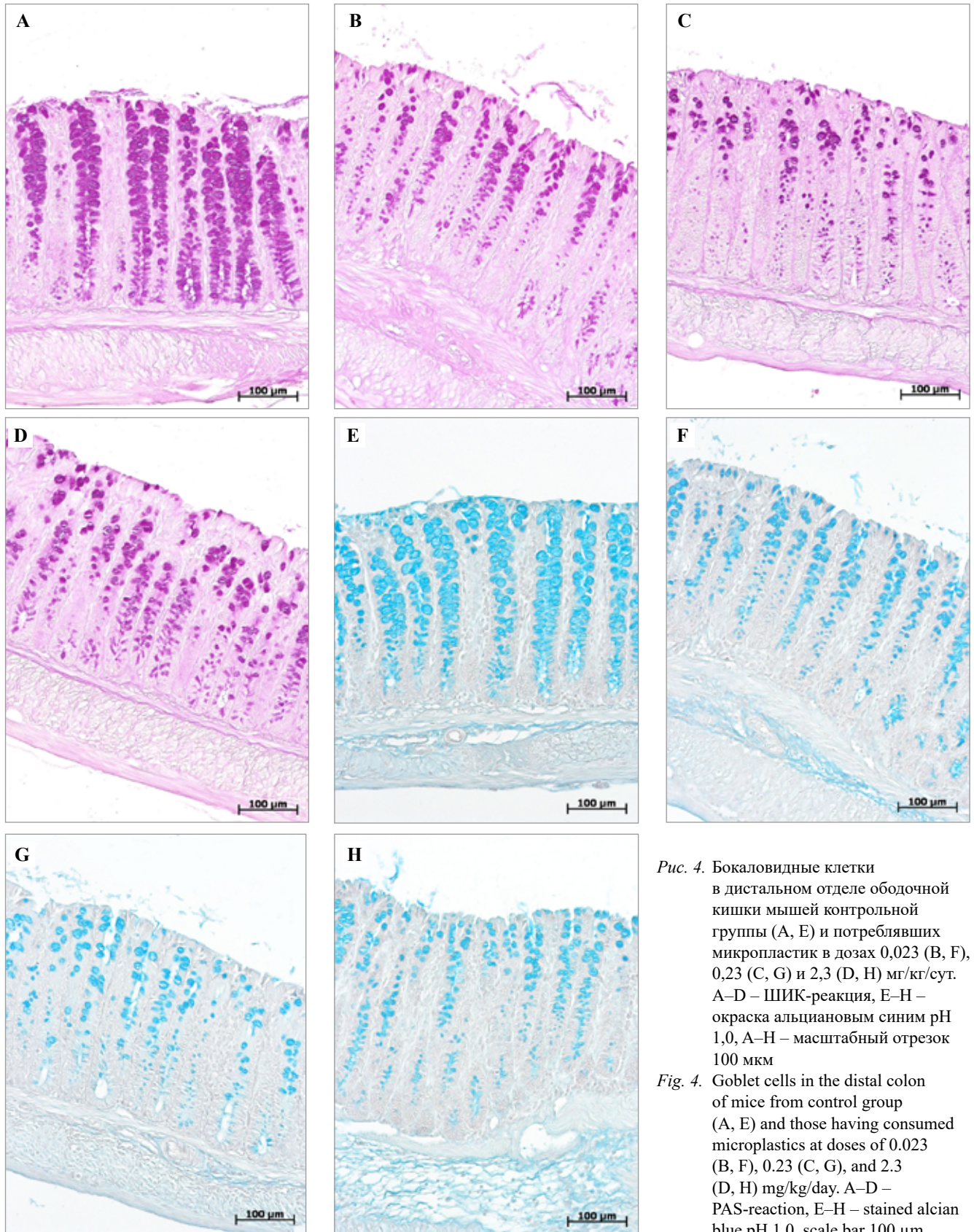


Рис. 3. Эндокринные клетки в дистальном отделе ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к хромогранину А, масштабный отрезок 200 мкм. Е – содержание хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки

Fig. 3. Endocrine cells in the distal colon of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics (MP) at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 (D) mg/kg/day. Immunofluorescent staining with chromogranin A antibodies, scale bar 200 µm. E – the content of chromogranin A-positive cells in the colon mucosa

муцинов между исследуемыми группами не различалось. Тем не менее по сравнению с контролем в группе мышей, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут, мы

наблюдали сдвиг соотношения нейтральных и высокосульфатированных муцинов в сторону нейтральных (рис. 4, 5).



*Рис. 4.* Бокаловидные клетки в дистальном отделе ободочной кишки мышей контрольной группы (А, Е) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В, F), 0,23 (С, G) и 2,3 (D, H) мг/кг/сут. А–D – ШИК-реакция, Е–H – окраска альциановым синим рН 1,0, А–H – масштабный отрезок 100 мкм

*Fig. 4.* Goblet cells in the distal colon of mice from control group (A, E) and those having consumed microplastics at doses of 0.023 (B, F), 0.23 (C, G), and 2.3 (D, H) mg/kg/day. A–D – PAS-reaction, E–H – stained alcian blue pH 1.0, scale bar 100 µm

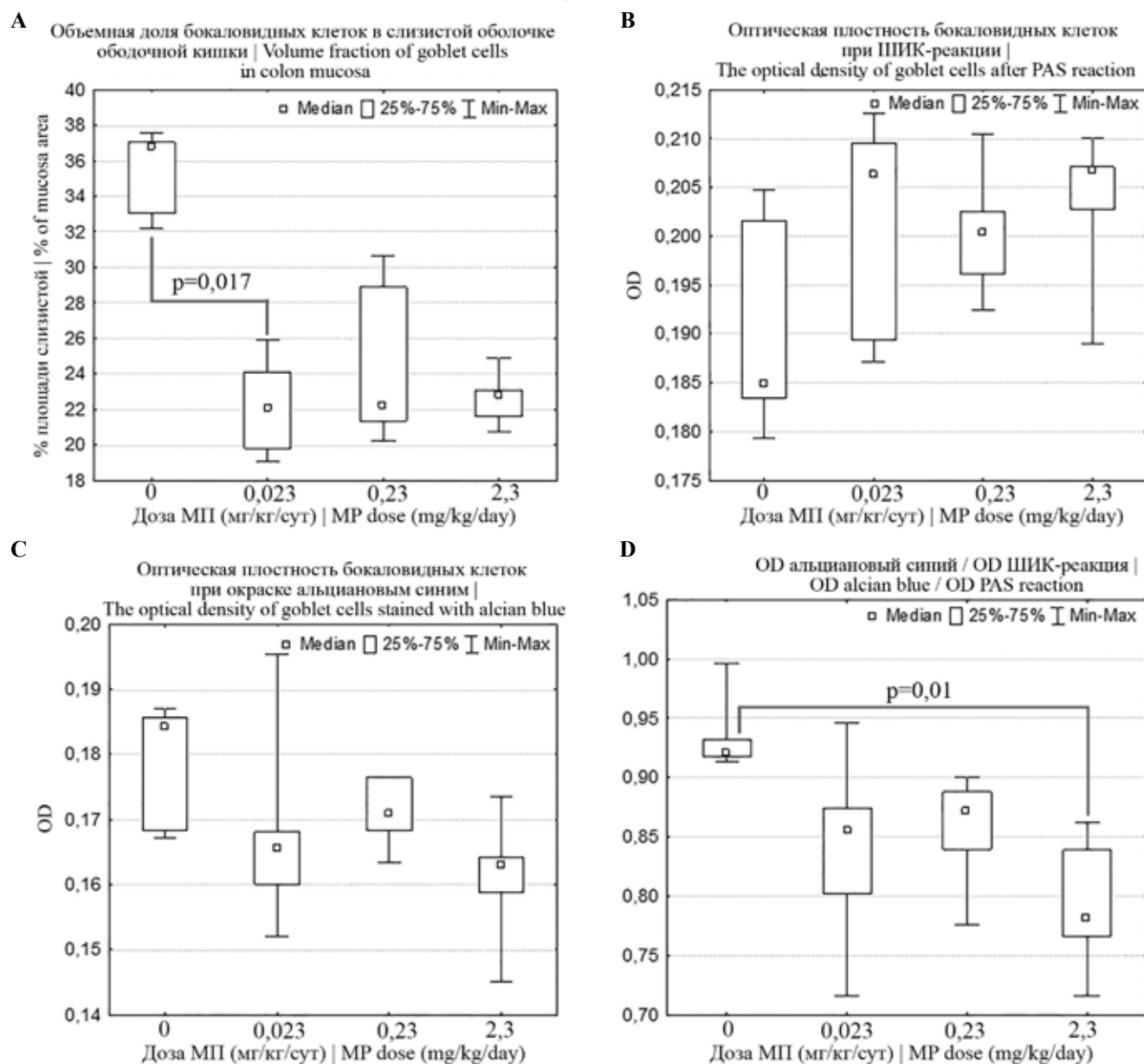


Рис. 5. Изменения параметров бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки при потреблении разных доз микропластика.

А – объемная доля бокаловидных клеток, В – оптическая плотность бокаловидных клеток при ШИК-реакции, С – оптическая плотность бокаловидных клеток при окраске альциановым синим pH 1,0, Д – отношение оптической плотности бокаловидных клеток при окраске альциановым синим к оптической плотности при ШИК-реакции. OD – оптическая плотность

Fig. 5. Changes in the parameters of goblet cells in the distal colon after consuming different doses of microplastics.

А – the volume fraction of goblet cells, В – the optical density of goblet cells in the PAS reaction, С – the optical density of goblet cells in alcian blue staining pH 1.0, Д – the ratio of the optical density of goblet cells after alcian blue staining to the optical density after PAS-reaction. OD – optical density

## Обсуждение

В связи с тем, что животные получали МП перорально с питьевой водой, первой мишенью воздействия были органы желудочно-кишечного тракта. В ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 при воздействии МП полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут в течение 4 недель на качественном

уровне мы отмечаем снижение числа и гипертрофию бокаловидных клеток, что указывает на гиперсекрецию и истощение запасов муцина. Бокаловидные клетки секретируют слизь, которая покрывает поверхность слизистой оболочки, способствует продвижению химуса, участвует в процессах пристеночного пищеварения, а также является первой линией защиты организма



от эндогенных и экзогенных раздражителей, препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов. Основным структурным компонентом слизи является высокогликозилированный белок – муцин Muc2. Концевые углеводные группы в молекуле муцина могут быть нейтральными – не модифицированными ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) либо кислыми – модифицированными остатками серной ( $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ) или сиаловых кислот. Нейтральные концевые группы выявляются с помощью ШИК-реакции, кислые – с помощью катионного красителя альцианового синего (при pH 1,0 он окрашивает сульфогруппы) [6]. При количественной оценке во всех опытных группах мы наблюдали выраженную тенденцию к снижению объемной доли бокаловидных клеток, однако статистической значимости различия достигали только в группе, получавшей пластик в наименьшей дозе – 0,023 мг/кг/сут. В разных работах значительно варьируют линии, пол животных, типы пластика, размеры частиц, дозы и сроки воздействия, что затрудняет сопоставление полученных нами данных с данными литературы. L. Lu et al. показали, что у самцов мышей ICR при потреблении микрочастиц полистирола диаметром 0,5 и 50 мкм в дозах 0,024 и 0,24 мг/кг/сут в течение 5 недель при окраске АВ-PAS (окраска альциановым синим, совмещенная с ШИК-реакцией) снижаются объемная доля бокаловидных клеток и яркость их окрашивания, но экспрессия мРНК Muc2 статистически значимо не изменяется, что указывает на гиперсекрецию слизи [7]. H. Sun et al. показали, что у самок мышей, потреблявших микрочастицы полиэтилена диаметром 1–10 мкм в дозе 0,2 мг/кг/сут в течение 30 дней, по данным окрашивания АВ-PAS значительно снижалась плотность муцина в толстой кишке, однако экспрессия мРНК Muc2 имела тенденцию к увеличению, что также указывает на повышение секреции слизи [8]. В исследовании Y. Jin et al. у самцов мышей ICR, получавших частицы полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,024 и 0,24 мг/кг/день в течение 6 недель, статистически значимо снижалась объемная доля бокаловидных клеток, окрашенных АВ-PAS, и при большей дозе снижалась экспрессия мРНК муцина Muc2 [9]. В нашем эксперименте интенсивность окрашивания бокаловидных клеток альциановым синим и при ШИК-реакции между группами статистически значимо не различалась, однако наблюдалась тенденция к смещению соотношения нейтральных и высокосульфатированных муцинов в сторону нейтральных. Предполагается, что кислые муцины, особенно сульфатированные, лучше, чем нейтральные, защищают от бактериальной транслокации, так как меньше подвержены разрушению бактериальными гидролазами. Снижение доли высокосульфатированных муцинов отмечается у мышей при экспериментальном язвенном колите [6]. В литературе данных о соотношении кислых и нейтральных муцинов в кишечнике под воздействием МП нет. Очевидно, повышение секреции слизи бокаловидными клетками является защитной реакцией, направленной на усиление

функции слизистого барьера и элиминацию микрочастиц из кишечника.

Эндокринные клетки составляют около 1% всех эпителиальных клеток кишечника, продуцируют гормоны и биологически активные вещества, регулирующие функции желудочно-кишечного тракта. В толстой кишке у мышей около 50% эндокринных клеток представлено ЕС-клетками, продуцирующими серотонин [10]. Серотонин стимулирует секрецию слизи бокаловидными клетками, выделение пищеварительных ферментов, подавляет образование соляной кислоты в желудке, тормозит всасывание воды и электролитов в кишечнике, усиливает его моторику. В секреторных гранулах ЕС-клеток вместе с серотонином накапливается небольшой кислый гликопротеин хромогранин А, являющийся маркером большинства клеток диффузной эндокринной системы [6]. Мы наблюдали увеличение содержания хромогранин А-положительных клеток у мышей, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут. Вероятно, повышение числа эндокринных клеток приводит к увеличению продукции серотонина, стимулирующего секрецию бокаловидных клеток, что вызвало наблюдаемое нами снижение объемной доли бокаловидных клеток. Данные литературы о влиянии МП на эндокринные клетки кишки отсутствуют.

Важную роль в барьерной функции играет локальная иммунная система. В соединительной ткани слизистой оболочки кишечника рассеяно множество иммунных клеток: лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, осуществляющие иммунный надзор над содержимым кишечника и препятствующие транслокации патогенов во внутреннюю среду организма. Кроме того, эпителиальные клетки кишечника несут ряд рецепторов к патогенассоциированным микробным паттернам и могут участвовать в регуляции иммунных реакций. При попадании в кишечник патогенных микроорганизмов, токсических веществ и нарушении целостности эпителиальной выстилки наблюдается выраженная воспалительная инфильтрация СПСО [6]. Мы не выявили увеличения содержания клеточных элементов в СПСО ободочной кишки у мышей, потреблявших МП. H. Sun et al. также не выявили воспалительных изменений в толстой кишке у самок мышей, потреблявших микрочастицы полиэтилена диаметром 1–10 мкм в дозе 0,2 мг/кг/сут в течение 30 дней [8]. Тем не менее в работах D.J. Rawle et al. и Y.J. Choi et al. в толстой кишке выявлено повышение экспрессии генов провоспалительных сигнальных путей у самок мышей C57BL/6J, получавших в течение 4 недель микрочастицы полистирола диаметром 1 мкм в дозе 0,08 мг/кг/сут, и у мышей ICR, получавших частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в течение 2 недель в дозах 0,2, 1 и 2 мг/кг/сут [11, 12].

Помимо реакции со стороны толстой кишки мы наблюдали активацию морфофункциональных зон селезенки, что, возможно, связано с повышением

проницаемости эпителиального барьера толстой кишки, вызванного истощением запасов слизи, и повышением транслокации просветных антигенов. Вероятно, наличие реакции со стороны селезенки, но отсутствие со стороны слизистой оболочки ободочной кишки обусловлено тем, что в кишечнике поддерживается иммунная толерантность к компонентам пищи и комменсальным микроорганизмам [6]. J. Qiao et al. отмечают, что у самцов мышей C57/B6, потреблявших частицы полистирола диаметром 0,07 мкм и 5 мкм в дозе 2 мг/кг/сут в течение 4 недель, в селезенке повышается содержание цитотоксических Т-лимфоцитов [13]. E.J. Park et al. у самок мышей ICR, потреблявших микрочастицы полиэтилена размером 40–48 мкм в дозах 3,75, 15 и 60 мг/кг/сут в течение 13 недель, выявили изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в селезенке, а на ультраструктурном уровне – повреждения органелл в клетках [14]. При этом S. Lee et al. не выявили изменений в селезенке у мышей ICR, получавших частицы полиэтилена размером 10–50 мкм в течение 28 дней в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг/сут [15].

Мы не выявили морфологических изменений в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, мышце бедра и семенниках у самцов мышей C57BL/6 при воздействии МП полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут в течение 4 недель. По данным L. Zhao et al., у самцов мышей C57BL/6J, которым на протяжении 4 недель ежедневно перорально вводили частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в дозе 20 мг/кг/сут, увеличивалась абсолютная и относительная масса печени, в ней наблюдались воспалительная инфильтрация, увеличение числа лимфоцитов, макрофагов и экспрессии провоспалительных цитокинов, повышалось содержание АЛТ и АСТ в сыворотке крови [16]. H. Zheng et al. показали, что у самцов мышей C57, получавших микрочастицы полистирола диаметром 5 мкм в течение 4 недель в дозе 0,1 мг/кг/сут, наблюдались накопление жировых вакуолей в гепатоцитах и выраженные метаболические изменения печени [17]. При исследовании почек мышей, получавших частицы полистирола диаметром 0,05, 0,3, 0,6 или 4 мкм в дозе примерно 200 мг/кг/сут в течение 4 недель, X. Meng et al. выявили морфологические изменения, такие как некроз и десквамация эпителия прямых и извитых почечных канальцев, разрушение щеточной каемки, расширение почечных канальцев и заполнение их гиалиновыми цилиндрами, фиброз, увеличение числа макрофагов. Кроме того, наблюдалось значительное повышение содержания в гомогенате почки миелопероксидазы, что указывает на нейтрофильную инфильтрацию [18]. S. Lee et al. при пероральном введении частиц полиэтилена размером 10–50 мкм в течение 4 недель в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг/сут у самцов и самок мышей ICR выявили МП в легких, при морфологическом исследовании обнаружили гранулемы [15]. Изменений в тимусе в этой работе выявлено

не было [15]. D.J. Rawle et al. методом RNA-Seq обнаружили у самок мышей C57BL/6J, потреблявших 80 мкг/кг/сут частиц полистирола размером 1 мкм с питьевой водой в течение 33–41 дня, в брыжеечных лимфатических узлах признаки слабо выраженной воспалительной реакции и лейкоцитоза [11]. По данным C.W. Lee et al., при пероральном введении частиц полистирола диаметром 2 мкм два раза в неделю в течение 8 недель в дозе 16 мг/кг у самок мышей C57BL/6 МП выявлялся в головном мозге, наблюдались изменения экспрессии генов в нейронах и нейровоспаление в гиппокампе, нарушения обучения и памяти [19]. У самцов крыс Вистар, потреблявших частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в дозе 5 мг/кг/сут в течение 90 дней, Z. Li et al. наблюдали интерстициальный отек и фиброз миокарда, ультраструктурные повреждения митохондрий кардиомиоцитов [20]. По результатам W. Shengchen et al., у самцов мышей C57BL/6, получавших с питьевой водой частицы полистирола диаметром 1–10 мкм или 50–100 мкм в дозе примерно 2,4 мг/кг/сут, морфологических изменений мышцы бедра не наблюдалось, но нарушалась ее регенерация после повреждения, вызванного инъекцией BaCl<sub>2</sub> [21]. Согласно ряду исследований, МП вызывает повреждения семенников. По данным X. Xie et al., пероральное введение частиц полистирола диаметром 5,0–5,9 мкм в дозах 0,4, 4 и 40 мг/кг/сут в течение 6 недель вызывает у мышей Balb/c снижение числа сперматогенных клеточек, количества сперматозоидов и концентрации тестостерона [22]. В. Hou et al. у мышей ICR, потреблявших частицы полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,024, 0,24 и 2 мг/кг/сут в течение 5 недель, наблюдали беспорядочное расположение сперматид в извитых семенных канальцах, снижение их количества, отслоение клеточек, уменьшение количества сперматозоидов в канальцах и увеличение числа апоптотических клеточек [23]. H. Jin et al. показали, что введение через желудочный зонд частиц полистирола размером 0,5, 4 и 10 мкм в течение 4 недель в дозе 40 мг/кг/сут у мышей BALB/C приводит к отслоению сперматогенных клеточек, их неупорядоченному расположению, появлению многоядерных гоноцитов в семявыносящих канальцах, снижению уровня тестостерона и значительному снижению подвижности сперматозоидов [24]. Противоречивость полученных нами данных и данных литературы об эффектах МП на внутренние органы, очевидно, обусловлена разными видами и линиями животных, размерами частиц и типами пластика, дозами и сроками воздействия.

## Заключение

Патологические изменения в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра самцов мышей C57BL/6 при потреблении в течение 4 недель частиц полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут не выявлены. При потреблении микропластика в дозе 2,3 мг/кг/сут выявлена антиген-

ная активация селезенки. В ободочной кишке наблюдается реакция секреторных клеток: увеличение числа эндокринных (2,3 мг/кг/сут) и снижение объемной доли бокаловидных клеток (0,023 мг/кг/сут). Мы предполагаем, что частицы микропластика механически раздражают слизистую, что вызывает повышение секреции эндокринными клетками серотонина, который стимулирует перистальтику кишки и секрецию слизи, а также замедляет всасывание воды из просвета, что в итоге приводит к гиперсекреции бокаловидных клеток, снижению их объемной доли, истощению запасов муцина и вымыванию слизи с микропластика из кишечника. Эти реакции являются адаптивными. Истощение запасов слизи, вероятно, приводит к повышению проницаемости эпителиального барьера толстой кишки. Локальный компартмент иммунной системы кишки поддерживает толерантность к просветным антигенам, но усиление их транспорта вызывает антигенную стимуляцию селезенки.

#### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.А. Золотова,

О.В. Макарова.

Сбор и обработка материала – Н.А. Золотова, Д.Ш. Джалилова,

И.С. Цветков, А.В. Сентябрева.

Написание текста – Н.А. Золотова.

Редактирование – О.В. Макарова.

#### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.A. Zolotova,

O.V. Makarova.

Collected the data and performed the analysis – N.A. Zolotova,

D.Sh. Dzhililova, I.S. Tsvetkov, A.V. Sentyabreva.

Wrote the paper – N.A. Zolotova.

Edited the manuscript – O.V. Makarova.

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

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

#### Литература/References

1. *Alabi OA, Ologbonjaye KI, Awosolu O, Alalade OE.* Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: A review. *J Toxicol Risk Assess.* 2019;5:021. DOI: 10.23937/2572-4061.1510021.
2. *Zolotova N, Kosyreva A, Dzhililova D, Fokichev N, Makarova O.* Harmful effects of the microplastic pollution on animal health: A literature review. *PeerJ.* 2022;10:e13503. DOI: 10.7717/peerj.13503.
3. *Yong CQY, Valiyaveetil S, Tang BL.* Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(5):1509. DOI: 10.3390/ijerph17051509.
4. *Елясин П.А., Залавина С.В., Машак А.Н., Овсянко Е.В., Айдагулова С.В.* Иммуногистохимическое исследование эффектов тяжелых металлов на слизистую оболочку тонкой кишки крыс препубертатного возраста. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2021;10(4):45–52. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.45-52.  
*Elyasin PA, Zalavina SV, Mashak AN, Ovsyanko EV, Aidagulova SV.* Immunohistochemical study the effects of heavy metals on the intestinal mucosa in prepubertal rats. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(4):45–52 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.45-52.
5. *Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Самедов В.Б., Колос Е.А., Коржевский Д.Э.* Иммуногистохимические маркеры для исследования органов пищеварительной системы. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2022;11(4):70–84. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.70-84.  
*Chumasov EI, Petrova ES, Samedov VB, Kolos EA, Korzhevskii DE.* Immunohistochemical markers to study the digestive organs. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(4):70–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.70-84.
6. *Золотова Н.А., Макарова О.В.* Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите. Москва: Группа МДВ, 2020. 112 с. Доступно по адресу: <https://istina.msu.ru/publications/book/521375693/> (получено 23.12.2022).  
*Zolotova NA, Makarova OV.* The epithelial barrier of the colon in normal individuals and in those with ulcerative colitis. Moscow: MDV Group, 2020. 112 p. (In Russ.). Available from: <https://istina.msu.ru/publications/book/521375693/> (accessed 23.12.2022).
7. *Lu L, Wan Z, Luo T, Fu Z, Jin Y.* Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci Total Environ.* 2018;631–632:449–58. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.051.
8. *Sun H, Chen N, Yang X, Xia Y, Wu D.* Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;220:112340. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112340.
9. *Jin Y, Lu L, Tu W, Luo T, Fu Z.* Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Sci Total Environ.* 2019;649:308–17. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.353.
10. *Billing LJ, Larraufie P, Lewis J, Leiter A, Li J, Lam B et al.* Single cell transcriptomic profiling of large intestinal enteroendocrine cells in mice – Identification of selective stimuli for insulin-like peptide-5 and glucagon-like peptide-1 co-expressing cells. *Mol Metab.* 2019;29:158–69. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.09.001.
11. *Rawle DJ, Dumenil T, Tang B, Bishop CR, Yan K, Le TT et al.* Microplastic consumption induces inflammatory signatures in the colon and prolongs a viral arthritis. *Sci Total Environ.* 2022;809:152212. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152212.
12. *Choi YJ, Kim JE, Lee SJ, Gong JE, Jin YJ, Seo S et al.* Inflammatory response in the mid colon of ICR mice treated with polystyrene microplastics for two weeks. *Lab Anim Res.* 2021;37(1):31. DOI: 10.1186/s42826-021-00109-w.
13. *Qiao J, Chen R, Wang M, Bai R, Cui X, Liu Y et al.* Perturbation of gut microbiota plays an important role in micro/nanoplastics-induced gut barrier dysfunction. *Nanoscale.* 2021;13(19):8806–16. DOI: 10.1039/d1nr00038a.
14. *Park EJ, Han JS, Park EJ, Seong E, Lee GH, Kim DW et al.* Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicol Lett.* 2020;324:75–85. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.01.008.
15. *Lee S, Kang KK, Sung SE, Choi JH, Sung M, Seong KY et al.* Toxicity study and quantitative evaluation of polyethylene

- microplastics in ICR mice. *Polymers (Basel)*. 2022;14(3):402. DOI: 10.3390/polym14030402.
16. Zhao L, Shi W, Hu F, Song X, Cheng Z, Zhou J. Prolonged oral ingestion of microplastics induced inflammation in the liver tissues of C57BL/6J mice through polarization of macrophages and increased infiltration of natural killer cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;227:112882. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112882.
  17. Zheng H, Wang J, Wei X, Chang L, Liu S. Proinflammatory properties and lipid disturbance of polystyrene microplastics in the livers of mice with acute colitis. *Sci Total Environ*. 2021;750:143085. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143085.
  18. Meng X, Zhang J, Wang W, Gonzalez-Gil G, Vrouwenvelder JS, Li Z. Effects of nano- and microplastics on kidney: Physicochemical properties, bioaccumulation, oxidative stress and immunoreaction. *Chemosphere*. 2022;288(Pt 3):132631. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132631.
  19. Lee CW, Hsu LF, Wu IL, Wang YL, Chen WC, Liu YJ et al. Exposure to polystyrene microplastics impairs hippocampus-dependent learning and memory in mice. *J Hazard Mater*. 2022;430:128431. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128431.
  20. Li Z, Zhu S, Liu Q, Wei J, Jin Y, Wang X et al. Polystyrene microplastics cause cardiac fibrosis by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and promoting cardiomyocyte apoptosis in rats. *Environ Pollut*. 2020;265(Pt A):115025. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115025.
  21. Shengchen W, Jing L, Yujie Y, Yue W, Shiwen X. Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. *J Hazard Mater*. 2021;417:125962. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125962.
  22. Xie X, Deng T, Duan J, Xie J, Yuan J, Chen M. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;190:110133. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.110133.
  23. Hou B, Wang F, Liu T, Wang Z. Reproductive toxicity of polystyrene microplastics: In vivo experimental study on testicular toxicity in mice. *J Hazard Mater*. 2021;405:124028. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124028.
  24. Jin H, Ma T, Sha X, Liu Z, Zhou Y, Meng X et al. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *J Hazard Mater*. 2021;401:123430. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123430.

### Информация об авторах

Наталья Александровна Золотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Джулия Шавкатовна Джалилова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александра Владиславовна Сентябрева – младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

### Author information

Natalya A. Zolotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Dzhuliya Sh. Dzhaliylova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Alexandra V. Sentyabreva – Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-5064-219x>

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>

## К 100-летию со дня рождения Владимира Аркадьевича Шахламова (1923–2005)

### To Vladimir A. Shakhlov's 100th anniversary (1923–2005)



1 сентября 2023 года исполнилось 100 лет со дня рождения члена-корреспондента РАМН, доктора медицинских наук, профессора, основателя и многолетнего руководителя лаборатории электронной микроскопии Института морфологии человека РАМН Владимира Аркадьевича Шахламова.

Малой родиной В.А. Шахламова является Ставрополь. После окончания школы в 1941 году он, как и многие сверстники с началом войны, ушел на фронт и вернулся в родной город только в 1946-м, закончив службу в Иране. Награжден орденом Отечественной войны II степени, а также боевыми медалями.

В 1948 году Владимир Аркадьевич поступил в Кубанский медицинский институт, но через год перевелся на лечебный факультет I-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова, который и закончил в 1954 году, продолжив обучение в аспирантуре на кафедре гистологии того же института у профессора В.Г. Елисева. В 1959 году В.А. Шахламов защитил кандидатскую диссертацию на тему «Морфологические и гистохимические изменения в очаге асептического воспаления яичников при экспериментальном воздействии на кору больших полушарий мозга».

В.А. Шахламов одним из первых в нашей стране освоил метод электронной микроскопии и под руководством академика РАМН Дмитрия Аркадьевича Жданова стал изучать ультраструктуру и проницаемость

стенки кровеносных и лимфатических капилляров. С 1961 года он продолжил эти исследования во вновь организованном Институте морфологии человека АМН СССР.

В 1965 году В.А. Шахламову было поручено организовать лабораторию электронной микроскопии. Своего здания Институт морфологии в 1960-х годах еще не имел (оно было только в проекте), поэтому лаборатории выделили небольшое помещение на первом этаже 9-го корпуса МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. В трех комнатах разместились три электронных микроскопа – два японских фирмы JEOL (JEM-6C и JEM-5Y) и один отечественный (ЭМ-7), ультратом фирмы LKB (Швеция), два вытяжных шкафа, кладовая, был отгорожен угол для фотолаборатории. Здесь же находились рабочие столы сотрудников и руководителя.

Электронная микроскопия дала возможность детально изучить всю панораму строения кровеносных и лимфатических капилляров – в разных органах, у человека и различных животных, в норме и разнообразных условиях (экспериментальных и патологических), что позволило Владимиру Аркадьевичу сделать принципиальные обобщения, в дальнейшем ставшие классическими. Это и классификация гемокapилляров по эндотелиальному и базальному слоям, и представления об органной специфичности стенки кровеносных капилляров, ультраструктурных проявлениях реактивных свойств эндотелия, закономерности проницаемости кровеносных и лимфатических капилляров, и многое другое. В цитопатологию были введены новые термины – «штокка мембран», «стропные филаменты», «плюс и минус мембрана», «микроклазмотоз», «юные митохондрии» и другие. Результаты данной работы обобщены в виде докторской диссертации на тему «Ультраструктура стенки кровеносных капилляров в нормальных, экспериментальных и некоторых патологических условиях», защита которой состоялась 15 декабря 1969 года, а затем и в монографии (В.А. Шахламов. Капилляры. М.: Медицина, 1971. 199 с.; В.А. Шахламов. Капилляры. М.: ВЕДИ, 2007. 288 с.). Эта книга быстро стала классической и была удостоена премии II степени им. академика В.П. Воробьева. В 1971 году также была опубликована монография В.А. Шахламова «Очерки по гемодинамической перестройке сосудистой стенки» (совместно с Е.К. Есиповой, О.Я. Кауфманом, Г.С. Крючковой, И.М. Яровой).

В 1973 году закончилось строительство здания Института морфологии человека на улице Цурюпы, дом 3, и лаборатория переехала на новое место. Условия для работы были замечательные. В микроскопных салонах стояли два электронных микроскопа JEM-100B, потом к ним присоединились JEM-100S, JEM-100 CX-II и сканирующий электронный микроскоп Hitachi S-500. В ультратомной комнате стояли несколько ультратомов фирмы LKB.

В целях наиболее полного обеспечения научных исследований и повышения эффективности использования уникальной дорогостоящей аппаратуры на базе лаборатории электронной микроскопии НИИ морфологии человека АМН СССР постановлением президиума АМН СССР была организована кустовая лаборатория электронной микроскопии тканей. Руководство лабораторией возложили на профессора В.А. Шахламова. В ее задачу входило обслуживание плановых электронно-микроскопических исследований институтов медико-биологического отделения академии. В лаборатории осваивались и внедрялись новые методы исследования: сканирующая электронная микроскопия, рентгеноспектральный микроанализ, иммуноцитохимия, биохимические и биофизические методы. Ультраструктурные аспекты патологии клетки изучались в свете прямого повреждающего воздействия агентов на клетку, ее реактивных состояний, интенсивного функционирования, адаптационных изменений, внутриклеточных регенераторных процессов, резерва адаптации, обратимости и необратимости деструктивных проявлений, запрограммированной клеточной смерти и т.д. Результаты исследований по ультраструктурным аспектам патологии клетки были суммированы в виде монографии (А.П. Авцын, В.А. Шахламов. Ультраструктурные ос-

новы патологии клетки. М.: Медицина, 1979. 317 с.). В 1988 году Владимир Аркадьевич был избран членом-корреспондентом АМН СССР.

В течение 22 лет В.А. Шахламов работал заместителем директора Института морфологии человека по научной работе, совмещая эту деятельность с заведованием лабораторией. Под его руководством выполнены 33 кандидатские и 20 докторских диссертаций. Более 20 лет В.А. Шахламов возглавлял проблемную комиссию РАМН «Морфогенез клетки, тканей, организма». Его труд отмечен рядом правительственных наград – орденом Знак Почета, медалями, а в 1999 году ему было присвоено звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации. На протяжении всего жизненного пути Владимира Аркадьевича Шахламова отличали трудолюбие, принципиальность, непрерывный творческий поиск и оптимизм.

*Д.А. Арешидзе,  
кандидат биологических наук,  
заведующий лабораторией патологии клетки  
НИИ морфологии человека имени  
академика А.П. Авцына  
ФГБНУ «РНЦХ имени академика  
Б.В. Петровского»*

*В.П. Черников,  
кандидат медицинских наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории патологии  
клетки НИИ морфологии человека  
имени академика А.П. Авцына  
ФГБНУ «РНЦХ имени академика  
Б.В. Петровского»*