

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 12 | № 4 | 2023

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

**«Клиническая
и экспериментальная
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность: 4 раза в год

Основан в 2011 году

Журнал индексируется в:

Scopus;

RSCI;

РИНЦ;

представлен в информационной
базе данных eLIBRARY.ru

Включен в перечень ВАК

Учредитель

ФГБНУ «РНЦХ

им. акад. Б.В. Петровского»

119435, Москва,

Абрикосовский пер., д. 2

Адрес редакции

117418, Москва,

ул. Цюрупы, д. 3

Заведующая редакцией

Куликова К.А.

Научный редактор

Васюкова О.А.

Телефоны +7 (499) 120-13-34

+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

www.mdv-group.ru

Подписные индексы:

70045 по каталогу
агентства «Урал-Пресс»

70045 по каталогу «Пресса
России» через агентство АРЗИ

Свидетельство о регистрации
средства массовой информации
ПИ № ФС77-83521
от 24 июня 2022 года.

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

Главный редактор

Михалева Л.М., член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор

Почетный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Ответственные секретари

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

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Коришинов А.Г., доктор мед. наук,
профессор, Гейдельберг, Германия

Кочуков М.Ю., кандидат мед. наук,
Хьюстон, США

Кушлинский Н.Е., академик РАН, доктор
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Никитюк Д.Б., академик РАН,
доктор мед. наук, профессор,
Москва, Россия

Николенко В.Н., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 12 | No 4 | 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”
Abrikosovskiy 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 № ФС77-83521
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

- А.И. Богатырева, Ю.В. Маркина, Т.В. Толстик,
Т.В. Кириченко, А.М. Маркин* 5 *A.I. Bogatyreva, Yu.V. Markina, T.V. Tolstik,
T.V. Kirichenko, A.M. Markin*
Метаболизм холестерина при ревматических
заболеваниях Cholesterol metabolism in rheumatic diseases

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

- Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова,
Е.Е. Воропаева, А.В. Затворницкая* 14 *E.L. Kazachkov, E.A. Kazachkova,
E.E. Voropaeva, A.V. Zatvornitskaya*
Гиперплазия эндометрия и микросателлитная
нестабильность: возможности прогнозирования
опухолевой трансформации эндометрия Endometrial hyperplasia and microsatellite instability:
possibilities for predicting tumor transformation of the
endometrium
- А.А. Ивина, Ю.О. Тигай, О.Ф. Рабинович,
В.А. Горячев, Д.Р. Фамилья Фриас, И.И. Бабиченко* 23 *A.A. Ivina, Yu.O. Tigay, O.F. Rabinovich,
V.A. Goryachev, D.R. Familia Frias, I.I. Babichenko*
Молекулярно-генетические критерии
малигнизации эпителия слизистой оболочки рта Molecular genetic criteria for oral mucosal epithelial
malignization
- В.П. Мамина* 32 *V.P. Mamina*
Морфологический анализ семенников в оценке
фертильности мышей после однократного острого
 γ -облучения разными дозами Assessing mouse fertility by morphological analysis
of testicles following acute γ -irradiation at various
doses
- Н.П. Бгатова, А.М. Рахметова, Ш.М. Жумадина,
Ю.С. Таскаева, Е.Л. Завьялов* 42 *N.P. Bgatova, A.M. Rakhmetova, Sh.M. Zhumadina,
Iu.S. Taskaeva, E.L. Zavjalov*
Ультраструктура эпителия проксимальных
канальцев почки при пероральном введении
карбоната лития в условиях опухолевого роста Ultrastructure of the kidney proximal tubular
epithelium during peroral administration of lithium
carbonate in tumor growth

- К.А. Артемьева, И.И. Степанова, Н.В. Низяева,
М.Н. Болтовская, И.М. Богданова, А.А. Степанов,
М.В. Кондашевская, Е.А. Пономаренко
Экспрессия ренина и ангиотензинпревращающего
фермента 2 в матке и плаценте
при иммунозависимых и ассоциированных
с преэклампсией спонтанных абортах у мышей
- 53 К.А. Artemyeva, I.I. Stepanova, N.V. Nizyaeva,
M.N. Boltovskaya, I.M. Bogdanova, A.A. Stepanov,
M.V. Kondashevskaya, E.A. Ponomarenko
Renin and angiotensin-converting enzyme 2 expression
in the uterus and placenta in immune-dependent and
preeclampsia-associated spontaneous abortions in mice
- Е.С. Петрова, Е.А. Колос
Морфологическое исследование процессов
валлеровской дегенерации в седалищном нерве
крысы после механического повреждения
- 62 E.S. Petrova, E.A. Kolos
Morphological analysis of Wallerian degeneration
in the rat sciatic nerve following mechanical damage
- Б.Б. Гагулаева, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин,
Е.П. Тимохина, В.В. Яглов
Изменения формирования селезенки
в раннем постнатальном периоде у крыс,
развивавшихся при низкодозовом
воздействии эндокринного дисраптора ДДТ
- 71 B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin,
E.P. Timokhina, V.V. Yaglov
Effects of low doses of endocrine disruptor DDT
on early postnatal spleen development in rats

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

- И.Д. Мусатов, А.С. Занозин, А.С. Тertychnyy,
Е.Д. Тетерина, С.Т. Авраамова,
Н.С. Александров, В.С. Пауков
Солитарная плазмоцитома верхней челюсти
- 80 I.D. Musatov, A.S. Zanozin, A.S. Tertychnyy,
E.D. Teterina, S.T. Avraamova,
N.S. Alexandrov, V.S. Paukov
Solitary plasmacytoma of the maxilla: a case report

ХРОНИКА EVENTS

- Всероссийская научная конференция
«Актуальные вопросы морфогенеза в норме
и патологии. Регенеративная биология
и медицина»
- 85 All-Russian scientific conference with international
participation "Current issues of normal
and pathological morphogenesis. Regenerative biology
and medicine"

Метаболизм холестерина при ревматических заболеваниях

А.И. Богатырева, Ю.В. Маркина, Т.В. Толстик, Т.В. Кириченко, А.М. Маркин

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

Резюме. Дислипидемия является традиционным фактором риска атеросклероза и наблюдается при большинстве ревматических заболеваний, что обуславливает высокий сердечно-сосудистый риск у пациентов с аутоиммунной патологией. В обзоре рассмотрены основные аспекты метаболизма холестерина при аутоиммунных ревматических заболеваниях, связанные с дисфункцией моноцитов и макрофагов. Изучение патогенетических механизмов обмена холестерина при хронических воспалительных заболеваниях имеет важное фундаментальное и клиническое значение, поскольку дает возможность разрабатывать новые диагностические алгоритмы и терапевтические подходы для снижения сердечно-сосудистого риска у данной категории пациентов, а также может стать основой для создания альтернативных стратегий воздействия на функции иммунных клеток.

Ключевые слова: метаболизм холестерина, дислипидемия, макрофаги, воспаление, аутоиммунные заболевания

Для корреспонденции: Юлия Владимировна Маркина. E-mail: yu.v.markina@gmail.com

Для цитирования: Богатырева А.И., Маркина Ю.В., Толстик Т.В., Кириченко Т.В., Маркин А.М. Метаболизм холестерина при ревматических заболеваниях. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.5-13.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (№ 123030700024-4).

Статья поступила 12.04.2023. Получена после рецензирования 11.05.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Cholesterol metabolism in rheumatic diseases

A.I. Bogatyreva, Yu.V. Markina, T.V. Tolstik, T.V. Kirichenko, A.M. Markin

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

Abstract. Dyslipidemia is a conventional risk factor for atherosclerosis and is observed in most rheumatic diseases, which leads to a high cardiovascular risk in patients with autoimmune pathology. The review considers the main aspects of cholesterol metabolism associated with dysfunction of monocytes and macrophages in autoimmune rheumatic diseases. The study of the pathogenetic mechanisms of cholesterol metabolism in chronic inflammatory diseases is of great fundamental and clinical importance, since it allows the development of new diagnostic algorithms and therapeutic approaches to reduce cardiovascular risks in these patients. Moreover, it can be used for creating alternative strategies to modify the functions of the immune system.

Keywords: cholesterol metabolism, dyslipidemia, macrophages, inflammation, autoimmune diseases

Corresponding author: Yuliya V. Markina. E-mail: yu.v.markina@gmail.com

For citation: Bogatyreva A.I., Markina Yu.V., Tolstik T.V., Kirichenko T.V., Markin A.M. Cholesterol metabolism in rheumatic diseases. Clin. exp. morphology. 2023;12(4):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.5-13.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery" (No. 123030700024-4).

Received 12.04.2023. Received in revised form 11.05.2023. Accepted 20.06.2023.

Введение

Аутоиммунные заболевания представляют собой группу гетерогенных болезней, поражающих множество органов и систем, которые приводят к высокой смертности и инвалидизации населения. С каждым

годом их распространенность увеличивается, однако сложная этиология в настоящий момент ограничивает понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что данная группа нозологий возникает

в результате взаимодействия как экологических, так и генетических факторов риска при относительном отсутствии защитных факторов [1]. Распространенность аутоиммунных заболеваний, по разным оценкам, в разных популяциях колеблется от 3 до 10% [2]. Они входят в число десяти ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире. Известно около 100 различных аутоиммунных ревматических заболеваний [3], среди которых наиболее распространены являются ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), системный склероз, синдром Шегрена, системный васкулит, псориатический артрит и другие [4].

В настоящее время активно изучаются механизмы взаимодействия иммунной системы с процессами метаболизма в патогенезе аутоиммунных ревматических заболеваний. Исследования сосредоточены на основных метаболических путях, включающих гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный путь, окисление и синтез жирных кислот, а также метаболизм аминокислот и липидов [5]. Системное хроническое воспаление сопровождается ревматическими заболеваниями и представляет собой важный патогенетический фактор прогрессирования ряда болезней, включая атеросклероз [6, 7]. Стоит отметить, что дислипидемия – традиционный фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и наблюдается при большинстве ревматических болезней. Повышенный уровень общего холестерина (ОХ), липопротеинов низкой плотности (ЛНП), триглицеридов (ТГ), а также низкое содержание липопротеинов высокой плотности (ЛВП) коррелируют с риском развития атеросклероза [8]. В целом, атеросклероз представляет собой многофакторное хроническое заболевание, при котором ключевую роль играет системное воспаление, поражающее крупные и средние сосуды. Атеросклероз рассматривают как болезнь накопления холестерина в интиме сосудов [9]. Хорошо известен факт, что модифицированные атерогенные ЛНП поглощаются клетками иммунной системы, в частности макрофагами, что приводит к образованию пенистых клеток и дальнейшему развитию атеросклеротических поражений [10]. В ряде исследований показано, что современные методы лечения ревматических заболеваний оказывают положительный эффект на метаболизм липидов и могут использоваться не только для терапии аутоиммунных осложнений, но и для коррекции сопутствующих сердечно-сосудистых [11].

РА является наиболее распространенным аутоиммунным ревматическим заболеванием с частотой встречаемости 0,5–1% в мире, сопровождается хроническим воспалением и разрушением суставов [12]. Механизмы, связывающие РА и ССЗ, включают общие медиаторы воспаления, посттрансляционные модификации белков и последующие иммунные реакции, изменения состава и функции липопротеинов, повышенный окислительный стресс и эндотелиальную дисфункцию. Известно,

что провоспалительные цитокины, участвующие в развитии РА, усиливают атерогенез [13].

СКВ – также системное аутоиммунное заболевание, при котором повышается продукция множественных аутоантител, которые связывают различные ядерные антигены. Циркулирующие иммунные комплексы откладываются в разных органах, включая почки, кожу и суставы, вызывая воспаление [14]. Этиология данного заболевания до сих пор точно не выяснена, но выявлены полиморфизмы различных генов, обуславливающие генетическую предрасположенность к развитию СКВ [15]. Показано, что у пациентов с СКВ атеросклероз развивается намного быстрее, чем у не имеющих данной патологии, причем сочетание факторов риска, таких как артериальная гипертензия, дислипидемия, повышенный уровень окисленных липидов, аутоантител и воспаления, может ускорять процессы атерогенеза [16].

Выявление факторов риска и изучение механизмов, способствующих прогрессированию аутоиммунных заболеваний, представляет интерес в современной науке. Все больше данных свидетельствует о центральной роли иммунной системы в патогенезе ССЗ, что открывает новые перспективы для разработки мер своевременной коррекции сердечно-сосудистого риска у пациентов с аутоиммунными ревматическими заболеваниями. В своем обзоре мы обобщили имеющиеся данные о влиянии метаболизма холестерина в макрофагах, ключевых участниках иммунных реакций, на развитие и прогрессирование атеросклероза при аутоиммунных заболеваниях.

Патофизиология обмена холестерина: роль макрофагов

Воспалительные механизмы, лежащие в основе аутоиммунных ревматических заболеваний, играют важную роль как в патогенезе развития сердечно-сосудистых событий, так и в атерогенезе. Неизвестно, являются ли медиаторы воспаления, которые способствуют развитию атеросклероза, общими для всех хронических воспалительных заболеваний [17]. В данной патологии несомненную значимость имеет нарушение процессов обмена холестерина, в частности поглощение холестерина макрофагами в интиме сосудов с образованием пенистых клеток [18]. Процессы метаболизма холестерина в организме в настоящее время хорошо изучены. В норме обратный транспорт холестерина является атеропротективным процессом, в котором большое значение имеют ЛВП, действующие как специфические акцепторы холестерина, которые переносят его избыточные запасы из периферических тканей в плазму, а затем доставляют в печень, где холестерин выводится с желчью [19]. Для обратного оттока холестерина должен находиться в неэтерифицированной форме. В экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в том числе при атеросклерозе, показано, что гидролиз липидных капель в пенистых клетках ограничивает скорость об-

ратного транспорта холестерина [20]. Избыток клеточного холестерина откладывается в виде эфиров холестерина, данный процесс катализируется ферментом холестеринацилтрансферазой (ХАТ). В процессе атерогенеза хроническое накопление эфиров холестерина в макрофагах вызывает пеннистость этих клеток и является признаком ранних стадий атеросклероза. В связи с этим ХАТ может стать эффективной лекарственной мишенью для терапии атеросклероза и других воспалительных заболеваний [21].

Известно большое количество ферментов, рецепторов и других факторов, снижение или повышение экспрессии которых может влиять на метаболизм холестерина в клетках. В частности, X-рецепторы печени (liver X receptor, LXR) являются ключевыми транскрипционными факторами в регуляции метаболизма липидов и гомеостаза холестерина. Помимо этого они влияют на врожденный и адаптивный иммунитет, включая ответы на воспалительные стимулы, пролиферацию и дифференцировку, миграцию и апоптоз [22]. Активация LXR приводит к индукции экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в процессах оттока холестерина, в частности АТФ-связывающего кассетного транспортера А1 (ATP binding cassette subfamily a member 1, ABCA1) и G1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1, ABCG1), аполипопротеина Е (apolipoprotein E, ApoE). Экспрессия этих факторов способствует переносу избыточного внутриклеточного холестерина к внеклеточным акцепторам (ЛВП, ApoE, аполипопротеин (apolipoprotein) А-I, ApoA-I) и обратному транспорту холестерина из периферических тканей [23]. Показано, что ABCA1 опосредует отток холестерина к ApoA-I, а ABCG1 – отток холестерина в ЛВП. Кроме того, рецептор-мусорщик класса В типа 1 (scavenger receptor class B type 1, SR-B1) также способствует оттоку холестерина в ЛВП [24]. В связи с этим особая роль в процессах метаболизма холестерина отводится ABCA1 и ABCG1, в настоящее время также рассматриваются как малые молекулы, воздействие на которые может служить эффективным средством терапии ССЗ. Показано, что агонисты рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором PPAR α и PPAR γ , увеличивают экспрессию ABCA1 и ABCG1 зависимым от LXR образом и также могут рассматриваться как эффективная терапевтическая мишень [25].

Следующий шаг после переноса холестерина на частицы ЛВП – его этерификация лецитинхолестеринацилтрансферазой (ЛХАТ) с образованием наиболее гидрофобной формы – эфиров холестерина (ЭХ). Ремоделирование холестерина ЛВП может происходить посредством гидролиза триглицеридов, опосредованного печеночной липазой, или фосфолипидов ЛВП за счет эндотелиальной липазы. Холестерин может проникать в макрофаги в результате поступления липопротеинов внутрь клетки или в результате эфферозитоза апоптотических клеток [26]. С целью предотвращения ток-

сичности избыток холестерина выводится из клеток к акцепторам или превращается в эфир холестерина, который хранится в цитозольных липидных каплях.

Помимо роли LXR в метаболизме холестерина важным механизмом регуляции повышенного уровня клеточного холестерина является ингибирование процессинга белка, связывающего регуляторный элемент стерола (sterol regulatory element-binding protein, SREBP), которое приводит к снижению экспрессии генов, регулирующих синтез (HMG-CoA reductase, *HMGCR*) и обратный захват холестерина (low density lipoprotein receptor, *LDLR*) [27]. Выделяют две разновидности белка: SREBP1 участвует в основном в регуляции генов, контролирующих синтез жирных кислот, а SREBP2 регулирует экспрессию генов биосинтеза холестерина, в том числе в ответ на его низкие уровни в клетках [28, 29]. В интронной области *SREBP* вследствие избытка клеточного холестерина происходит снижение экспрессии микроРНК, miR-33, мишенями репрессии трансляции которой являются мРНК, кодирующие многочисленные факторы метаболизма холестерина, в том числе ABCA1 [30]. Неактивные формы SREBP находятся в мембране эндоплазматического ретикула, транспорт которых осуществляется в аппарат Гольджи SCAP – белком, активирующим расщепление SREBP. N-концевые домены SCAP могут объединяться с инсулининдуцированным геномным белком (INSIG), образуя комплекс INSIG/SCAP/SREBP. При снижении уровня стеролов SCAP диссоциирует от INSIG и опосредует SREBP, транспортируя комплекс SCAP/SREBP из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи. Далее в аппарате Гольджи SREBP расщепляется сериновыми протеазами S1P и S2P, высвобождая транскрипционно активные N-концевые домены, после чего перемещается в ядро и связывается с регуляторными элементами генов, контролирующих синтез холестерина и ненасыщенных жирных кислот [31].

Известно, что SCAP регулирует метаболизм липидов в органах и тканях, таких как печень и мышцы, однако влияние дефицита SCAP, специфичного для макрофагов, в макрофагах жировой ткани у пациентов с метаболическими заболеваниями до конца не изучено. Регуляция сигнального пути SCAP/SREBP в макрофагах может обеспечить новую терапевтическую стратегию в лечении дислипидемий при разных воспалительных заболеваниях [32, 33].

В норме макрофаги поглощают липопротеиды, попадающие в интиму сосудов, таким образом усваивая холестерин, а его избыток возвращается в кровоток, затем поглощается и выводится печенью. Отток холестерина из клеток включает несколько механизмов, один из которых заключается в перемещении холестерина в ЛВП посредством прямого взаимодействия между ЛВП и транспортерами АТФ-связывающей кассеты (ATP-binding cassette, ABC) на поверхности плазматической мембраны. Экспрессия транспортеров ABC регулируется факторами LXR, которые активируются

стеролами [34]. Другим механизмом оттока холестерина из макрофагов является высвобождение так называемых микрочастиц, везикул или экзосом, происходящих из плазматической мембраны и содержащих холестерин [35]. Данный факт способствовал обнаружению того, что ABCA1-дефицитные макрофаги могут переносить холестерин в соседние гладкомышечные клетки (ГМК). В экспериментах в клеточной культуре выявлено, что холестерин перемещается из макрофагов в ГМК через мембранные соединения между различными клетками [36]. Еще один путь транспорта холестерина опосредуется белками, родственными домену связывания оксистерола (OSBP) – ORP [37]. Данные протеины входят в семейство белков, которые могут способствовать неvesикулярному переносу холестерина между липидными бислоями, увеличивая эффективность транспорта холестерина между субклеточными мембранными органеллами [38]. Выявлено, что один из белков этого семейства – ORP6 – регулирует отток холестерина и гомеостаз ЛВП и может представлять собой новый регулятор пути обратного транспорта холестерина. Транскрипция гена этого белка регулируется факторами транскрипции LXR, которые активируются в ответ на повышение уровня клеточного холестерина и координируют экспрессию генов, участвующих в доставке, оттоке и экскреции холестерина [27]. Так, в исследованиях повышение экспрессии LXR в макрофагах оказывало антиатерогенное действие за счет

увеличения оттока холестерина, а потеря LXR приводила к заметному увеличению размера атеросклеротического поражения [39]. Кроме того, на первичной культуре CD4+ Т-клеток человека было показано, что в Т-клетках LXR регулировал метаболизм холестерина и гликофинголипидов, а также активация LXR ослабляла провоспалительную функцию Т-клеток [40]. Тем не менее последние данные показывают, что ингибирование LXR вызывает дифференцировку макрофагов по противовоспалительному фенотипу, и предлагают использование антагонистов LXR в качестве потенциальных терапевтических стратегий лечения иммуновоспалительных заболеваний [41]. На рисунке представлены основные этапы метаболизма холестерина в организме.

Метаболизм холестерина в макрофагах при аутоиммунных ревматических заболеваниях

Ревматоидный артрит

РА является независимым сердечно-сосудистым фактором риска, повышающим риск развития атеросклероза примерно на 50%, включая пациентов с ранней и субклинической стадией [42]. Механизмы, способствующие ускорению данного процесса, до конца не изучены, но ведущую роль в этом играет системное воспаление, которое считается основным фактором атерогенеза при РА [43]. Показано, что у пациентов с РА по

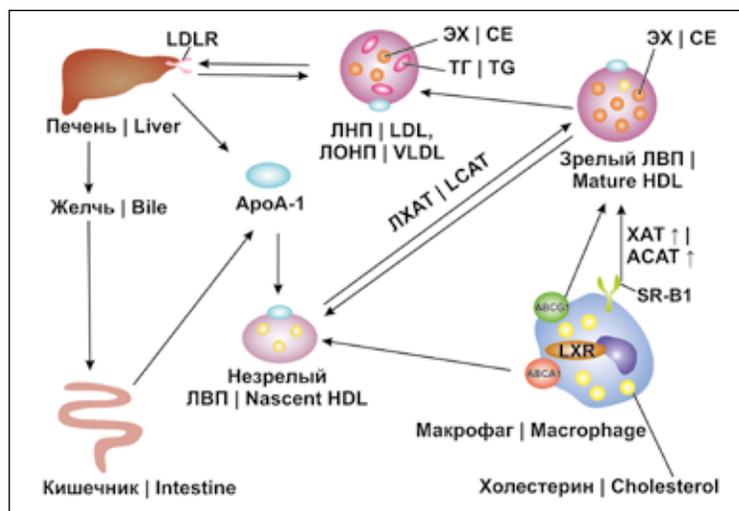


Рис. Метаболизм холестерина

ЛНП – липопротеины низкой плотности, ЛВП – липопротеины высокой плотности, ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности, ТГ – триглицериды, ЭХ – эфиры холестерина, ЛХАТ – лецитинхолестеринацилтрансфераза, ХАТ – холестеринацилтрансфераза, LDL-R – рецептор липопротеинов низкой плотности, LXR – X-рецепторы печени, SR-B1 – рецептор-мусорщик класса В типа 1, ABCA1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер А1, ABCG1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер G1, ApoA-I – аполипопротеин А1

Fig. Cholesterol metabolism

LDL – low density lipoprotein, HDL – high-density lipoprotein, VLDL – very-low-density lipoprotein, TG – triglycerides, CE – cholesterol ester, LCAT – lecithin cholesterol acyltransferase, CAT – cholesterol acyltransferase, LDLR – low-density lipoprotein receptor, LXR – liver X receptor, SR-B1 – scavenger receptor class B type 1, ABCA1 – ATP binding cassette transporter A1, ABCG1 – ATP binding cassette transporter G1, ApoA-I - apolipoprotein A-I

сравнению со здоровыми людьми наблюдается большее количество циркулирующих CD14+ моноцитов в крови, причем после стимуляции ЛПС они продуцируют провоспалительные медиаторы (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-27, CXCL10, CXCL11) с большей экспрессией [44].

Плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки, а также образующиеся из них миелоидные клетки (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, тромбоциты и другие) регулируют отток холестерина, как было описано ранее, через АТФ-связывающие кассетные транспортеры ABCA1 и ABCG1 и их внутренний клеточный лиганд ApoE [45]. В исследованиях показано, что у пациентов с РА наблюдается нарушение оттока холестерина из-за подавления экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1*, а также *ApoE* [46]. Данные нарушения метаболизма холестерина в макрофагах могут способствовать изменению гомеостаза клеточного холестерина, увеличению секреции воспалительных цитокинов, повышая риск ССЗ [47].

В исследованиях на животных обнаружено, что ревматоидный артрит может ускорять процессы атерогенеза независимо от системного уровня холестерина в плазме крови [48]. В результате развития системного воспаления происходит нарушение метаболизма внутриклеточного холестерина, которое приводит к гиперпролиферации клеток-предшественников и усилению миелопоэза. Миелоидные клетки сохраняют этот дефект в метаболизме холестерина, что способствует появлению пенистых клеток и увеличению частоты сердечно-сосудистых осложнений при прогрессировании РА [48]. У пациентов с РА нарушено участие ЛВП в оттоке холестерина, что коррелирует с показателями системного воспаления и антиоксидантными свойствами ЛВП, в частности повышенной активностью миелопероксидазы, которая также повышена при сердечно-сосудистых поражениях, в том числе при атеросклерозе [49].

Системная красная волчанка

При СКВ одной из ведущих причин смертности являются ССЗ, в основе которых лежит атеросклероз [50]. У пациентов, страдающих СКВ, наблюдаются снижение уровня ЛВП, нарушение антиоксидантных функций, а также эффективного оттока холестерина. В исследованиях показано, что у пациентов с СКВ в 10 раз чаще наблюдалось снижение функциональной активности ЛВП, чем у не имеющих данной патологии, причем эта способность обратно коррелировала с наличием атеросклеротических бляшек в бассейне сонных артерий [51]. В другом исследовании при СКВ отмечены повышенные уровни окисленных ЛНП, которые были связаны с ССЗ в анамнезе и утолщением слоя интима-медиа сонных артерий [52]. Ключевым атеропротективным механизмом является удаление избыточного холестерина из макрофагов. Как уже было отмечено, в этом процессе важную роль играет обратный транспорт холестерина из макрофагов с участием

ЛВП [53]. Снижение способности ЛВП к регуляции оттока холестерина при СКВ ассоциировано с повышением уровня белка сывороточного амилоида А (serum amyloid A, SAA). В исследованиях показано, что повышенные уровни SAA способствуют дисфункции ЛВП и снижают способность выведения холестерина из макрофагов и транспорта эфиров холестерина в печень [54]. Сообщается, что SAA обладает провоспалительными и проатерогенными свойствами и, таким образом, может влиять на развитие атеросклероза при данной патологии [55]. Кроме того, нарушение процесса оттока холестерина может быть связано с окислением ApoA-I, в результате которого ЛВП изменяют свои функции. При окислении остатка метионина в ApoA-I ЛВП теряют способность взаимодействовать с ЛХАТ, в связи с чем ApoA-I может быть ключевым фактором нарушения процесса оттока холестерина при СКВ [56]. Также ЛВП могут непосредственно воздействовать на воспалительные процессы, ослабляя передачу сигналов толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) и уменьшая этим выработку провоспалительных цитокинов. Помимо этого, ЛВП могут индуцировать экспрессию активирующего фактора транскрипции 3 (ATF3), который играет ключевую роль в транскрипции генов врожденного иммунного ответа, и тем самым снижать экспрессию TLR-индуцированных провоспалительных цитокинов. ЛВП также снижают экспрессию молекул клеточной адгезии, активируемых ядерным фактором-кВ (NF-кВ), чем оказывают проатерогенное действие [57]. В исследованиях показано, что ЛВП, полученные от пациентов с СКВ, индуцируют провоспалительный ответ, в отличие от ЛВП здоровых людей. В частности, ЛВП при СКВ не способны ингибировать TLR-опосредованную индукцию цитокинов [58, 59]. Помимо этого у пациентов с СКВ ЛВП способны напрямую активировать рецептор тромбоцитарного фактора роста β (PDGFR β), а также увеличивать хемотаксис и высвобождение ФНО- α , усиливающих воспаление [58].

Другие аутоиммунные ревматические заболевания

РА и СКВ являются наиболее распространенными и изученными аутоиммунными ревматическими заболеваниями. Однако при других заболеваниях также происходят нарушения в метаболизме холестерина, способствующие прогрессированию болезни и развитию сопутствующей сердечно-сосудистой патологии. Так, при рассеянном склерозе провоспалительные липопротеины обуславливают возникновение некоторых типичных клинических симптомов, характерных для аутоиммунных ревматических заболеваний, в частности это отек, боль, скованность в суставах [11]. В нескольких исследованиях подтверждена связь нарушения метаболизма холестерина с неблагоприятными клиническими исходами при рассеянном склерозе [60]. Кроме того, для пациентов с рассеянным склерозом свойственно повышение уровня ApoB и ЛНП, которые

положительно коррелируют с развитием заболевания, а также участие LXR в данных процессах [61]. Для псориаза, тоже являющегося аутоиммунным заболеванием, характерно нарушение метаболизма липидов [62]. Данные исследований показывают значительное повышение уровня общего холестерина и ЛНП у пациентов с псориазом в отличие от здоровых людей [63].

Заключение

В обзоре рассмотрены основные аспекты метаболизма холестерина при аутоиммунных ревматических заболеваниях. Дисфункция моноцитов и макрофагов при хронических воспалительных заболеваниях приводит к нарушению липидного обмена и имеет ключевое значение в атерогенезе, что обуславливает высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с ревматическими заболеваниями. Изучение патогенетических аспектов обмена холестерина при хронических воспалительных заболеваниях имеет важное фундаментальное и клиническое значение, поскольку дает возможность разработки новых диагностических алгоритмов и терапевтических подходов для снижения сердечно-сосудистого риска у данной категории пациентов, а также может стать основой для создания альтернативных стратегий воздействия на функции иммунных клеток.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Schiffenbauer A, Miller FW. Noninfectious environmental agents and autoimmunity. In: NR Rose, IR Mackay (eds.) *The Autoimmune Diseases*. 6th ed. Academic Press, 2020. P. 345–62. DOI: 10.1016/B978-0-12-812102-3.00020-8.
2. Vargas-Uricoechea H. Molecular mechanisms in autoimmune thyroid disease. *Cells*. 2023;12(6):918. DOI: 10.3390/cells12060918.
3. Simon TA, Kawabata H, Ray N, Baheti A, Suissa S, Esdaile JM. Prevalence of co-existing autoimmune disease in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Adv Ther*. 2017;34(11):2481–90. DOI: 10.1007/s12325-017-0627-3.
4. Alexandropoulou I, Grammatikopoulou MG, Gkouskou KK, Pritsa AA, Vassilakou T, Rigopoulou E et al. Ceramides in autoimmune rheumatic diseases: existing evidence and therapeutic considerations for diet as an anticeramid treatment. *Nutrients*. 2023;15(1):229. DOI: 10.3390/nu15010229.
5. Rhoads JP, Major AS, Rathmell JC. Fine tuning of immunometabolism for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(5):313–20. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.54.
6. Ruscitti P, Di Muzio C, Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, Navarini L et al. Cardiometabolic multimorbidity may identify a more severe subset of rheumatoid arthritis, results from a “real-life” study. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(14):e33362. DOI: 10.1097/MD.00000000000033362.
7. Михалева Л.М., Конопляников А.Г., Кудрявцева Я.Ю., Оленев А.С., Грачева Н.А., Бирюков А.Е. и др. Экстрагенитальная неинфекционная патология в структуре материнской смертности г. Москвы. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021;10(2):21–31. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.21-31.
Mikhaleva LM, Konoplyannikov AG, Kudryavtseva YY, Olenev AS, Gracheva NA, Biryukov AE et al. Extragenital noninfectious pathology in the maternal mortality structure in Moscow. *Clinical and experimental morphology*. 2021;10(2):21–31 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.21-31.
8. Mahmoud NF, Allam NM, Omara II, Fouada HA. Efficacy of Siwan traditional therapy on erythrocyte sedimentation rate, lipid profile, and atherogenic index as cardiac risk factors related to rheumatoid arthritis. *Medicina (Kaunas)*. 2022;59(1):54. DOI: 10.3390/medicina59010054.
9. Libby P. The changing Nature of atherosclerosis: what we thought we knew, what we think we know, and what we have to learn. *Eur Heart J*. 2021;42(47):4781–2. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab438.
10. Маркин А.М., Маркина Ю.В., Сухоруков В.Н., Хайлов А.М., Орехов А.Н. Роль физических нагрузок в развитии атеросклеротических поражений сосудистой стенки. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(4):25–31. DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.25-31.
Markin AM, Markina YuV, Sukhorukov VN, Khaylov AM, Orekhov AN. The role of physical activity in the development of atherosclerotic lesions of the vascular wall. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(4):25–31 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.25-31.
11. Robinson G, Pineda-Torra I, Ciurtin C, Jury EC. Lipid metabolism in autoimmune rheumatic disease: implications for modern and conventional therapies. *J Clin Invest*. 2022;132(2):e148552. DOI: 10.1172/JCI148552.
12. Venetsanopoulou AI, Kalpourtzi N, Alamanos Y, Gavana M, Vantarakis A, Hadjichristodoulou C et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Greece: results from the national health examination survey EMENO. *Rheumatol Int*. 2023;43(7):1349–55. DOI: 10.1007/s00296-023-05316-3.
13. Fazeli MS, Khaychuk V, Wittstock K, Breznen B, Crockett G, Pourrahmat MM et al. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: risk factors, autoantibodies, and the effect of anti-rheumatic therapies. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2021;14:11795441211028751. DOI: 10.1177/11795441211028751.
14. Yang Y, Liu K, Liu M, Zhang H, Guo M. EZH2: Its regulation and roles in immune disturbance of SLE. *Front Pharmacol*. 2022;13:1002741. DOI: 10.3389/fphar.2022.1002741.
15. Ebrahimiyan H, Mostafaei S, Aslani S, Faezi ST, Farhadi E, Jamshidi A et al. Association between complement gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2022;22(3):427–38. DOI: 10.1007/s10238-021-00758-0.
16. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease with an autoimmune component. *Circ Res*. 2018;123(10):1118–20. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313816.
17. Thakur M, Evans B, Schindewolf M, Baumgartner I, Döring Y. Neutrophil extracellular traps affecting cardiovascular health in

- infectious and inflammatory diseases. *Cells*. 2021;10(7):1689. DOI: 10.3390/cells10071689.
18. *Nordestgaard BG*. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ Res*. 2016;118(4):547–63. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306249.
 19. *Gulshan K*. Crosstalk between cholesterol, ABC transporters, and PIP2 in inflammation and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1422:353–77. DOI: 10.1007/978-3-031-21547-6_13.
 20. *Goldberg IJ, Reue K, Abumrad NA, Bickel PE, Cohen S, Fisher EA et al*. Deciphering the role of lipid droplets in cardiovascular disease: a report from the 2017 national heart, lung, and blood institute workshop. *Circulation*. 2018;138(3):305–15. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033704.
 21. *Maja M, Tyteca D*. Alteration of cholesterol distribution at the plasma membrane of cancer cells: from evidence to pathophysiological implication and promising therapy strategy. *Front Physiol*. 2022;13:999883. DOI: 10.3389/fphys.2022.999883.
 22. *Liu B, Ma Y, Huang Y, Liu Z, Ruan Q, Qi Y*. Inhibition of human cytomegalovirus particle maturation by activation of liver X receptor. *Front Microbiol*. 2022;13:846386. DOI: 10.3389/fmicb.2022.846386.
 23. *Juhl AD, Wüstner D*. Pathways and mechanisms of cellular cholesterol efflux-insight from imaging. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:834408. DOI: 10.3389/fcell.2022.834408.
 24. *Endo Y, Fujita M, Ikewaki K*. HDL functions-current status and future perspectives. *Biomolecules*. 2023;13(1):105. DOI: 10.3390/biom13010105.
 25. *Frambach SJCM, de Haas R, Smeitink JAM, Rongen GA, Russel FGM, Schirris TJJ*. Brothers in arms: ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux as promising targets in cardiovascular disease treatment. *Pharmacol Rev*. 2020;72(1):152–90. DOI: 10.1124/pr.119.017897.
 26. *Chiang JYL, Ferrell JM, Wu Y, Boehme S*. Bile acid and cholesterol metabolism in atherosclerotic cardiovascular disease and therapy. *Cardiol Plus*. 2020;5(4):159–70. PMID: 34350368.
 27. *Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA*. HDL and reverse cholesterol transport: basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. *Circ Res*. 2019;124(10):1505–18. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.312617.
 28. *Li Y, Wu S, Zhao X, Hao S, Li F, Wang Y et al*. Key events in cancer: dysregulation of SREBPs. *Front Pharmacol*. 2023;14:1130747. DOI: 10.3389/fphar.2023.1130747.
 29. *Madison BB*. Srebp2: a master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res*. 2016;57(3):333–5. DOI: 10.1194/jlr.C066712.
 30. *Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N et al*. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328(5985):1570–3. DOI: 10.1126/science.1189862.
 31. *Le F, Lou HY, Wang QJ, Wang N, Wang LY, Li LJ et al*. Increased hepatic INSIG-SCAP-SREBP expression is associated with cholesterol metabolism disorder in assisted reproductive technology-conceived aged mice. *Reprod Toxicol*. 2019;84:9–17. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.12.003.
 32. *Lee JH, Lee SH, Lee EH, Cho JY, Song DK, Lee YJ et al*. SCAP deficiency facilitates obesity and insulin resistance through shifting adipose tissue macrophage polarization. *J Adv Res*. 2023;45:1–13. DOI: 10.1016/j.jare.2022.05.013.
 33. *Miyata S, Kodaka M, Kikuchi A, Matsunaga Y, Shoji K, Kuan YC et al*. Sulforaphane suppresses the activity of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) by promoting SREBP precursor degradation. *Sci Rep*. 2022;12(1):8715. DOI: 10.1038/s41598-022-12347-6.
 34. *He C, Hu X, Weston TA, Jung RS, Sandhu J, Huang S et al*. Macrophages release plasma membrane-derived particles rich in accessible cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(36):E8499–508. DOI: 10.1073/pnas.1810724115.
 35. *Dergunov AD, Baserova VB*. Different pathways of cellular cholesterol efflux. *Cell Biochem Biophys*. 2022;80(3):471–81. DOI: 10.1007/s12013-022-01081-5.
 36. *He C, Jiang H, Song W, Riezman H, Tontonoz P, Weston TA et al*. Cultured macrophages transfer surplus cholesterol into adjacent cells in the absence of serum or high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(19):10476–83. DOI: 10.1073/pnas.1922879117.
 37. *Radulovic M, Wenzel EM, Gilani S, Holland LK, Lystad AH, Phuyal S et al*. Cholesterol transfer via endoplasmic reticulum contacts mediates lysosome damage repair. *EMBO J*. 2022;41(24):e112677. DOI: 10.15252/embj.2022112677.
 38. *Kentala H, Weber-Boyvat M, Olkkonen VM*. OSBP-related protein family: mediators of lipid transport and signaling at membrane contact sites. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;321:299–340. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.09.006.
 39. *Teupser D, Kretschmar D, Tennert C, Burkhardt R, Wilfert W, Fengler D et al*. Effect of macrophage overexpression of murine liver X receptor-alpha (LXR-alpha) on atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):2009–15. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.175257.
 40. *Waddington KE, Robinson GA, Rubio-Cuesta B, Chrifi-Alaoui E, Andreone S, Poon KS et al*. LXR directly regulates glycosphingolipid synthesis and affects human CD4+ T cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(21):e2017394118. DOI: 10.1073/pnas.2017394118.
 41. *de la Aleja AG, Herrero C, Torres-Torresano M, Schiaffino MT, del Castillo A, Alonso B et al*. Inhibition of LXR controls the polarization of human inflammatory macrophages through upregulation of MAFB. *Cell Mol Life Sci*. 2023;80(4):96. DOI: 10.1007/s00018-023-04745-4.
 42. *Gerasimova EV, Popkova TV, Gerasimova DA, Markina YV, Kirichenko TV*. Subclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis at low cardiovascular risk. *Biomedicines*. 2023;11(3):974. DOI: 10.3390/biomedicines11030974.
 43. *Pašková U*. Lipid profile and risks of cardiovascular diseases in conditions of rheumatoid arthritis. *Ceska Slov Farm*. 2019;68(6):219–28. PMID: 31906689.
 44. *McGarry T, Hanlon MM, Marzaioli V, Cunningham CC, Krishna V, Murray K et al*. Rheumatoid arthritis CD14+ monocytes display metabolic and inflammatory dysfunction, a phenotype that precedes clinical manifestation of disease. *Clin Transl Immunology*. 2021;10(1):e1237. DOI: 10.1002/cti2.1237.
 45. *Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL et al*. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocy-

- toxis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4138–49. DOI: 10.1172/JCI57559.
46. *Quevedo-Abeledo JC, Sánchez-Pérez H, Tejera-Segura B, de Armas-Rillo L, Armas-González E, Machado JD et al.* Differences in capacity of high-density lipoprotein cholesterol efflux between patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2021;73(11):1590–6. DOI: 10.1002/acr.24407.
 47. *Duan Y, Gong K, Xu S, Zhang F, Meng X, Han J.* Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):265. DOI: 10.1038/s41392-022-01125-5.
 48. *Dragoljevic D, Kraakman MJ, Nagareddy PR, Ngo D, Shihta W, Kammoun HL et al.* Defective cholesterol metabolism in haematopoietic stem cells promotes monocyte-driven atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Eur Heart J.* 2018;39(23):2158–67. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy119.
 49. *Charles-Schoeman C, Wang J, Shahbazian A, Wilhalme H, Brook J, Kaeley GS et al.* Power doppler ultrasound signal predicts abnormal HDL function in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2023;43(6):1041–53. DOI: 10.1007/s00296-023-05285-7.
 50. *Richter P, Cardoneanu A, Rezus C, Burlui AM, Rezus E.* Non-traditional pro-inflammatory and pro-atherosclerotic risk factors related to systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12604. DOI: 10.3390/ijms232012604.
 51. *McMahon M, Seto R, Skaggs BJ.* Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Immunol Res.* 2021;2(3):157–72. DOI: 10.2478/rir-2021-0022.
 52. *Frostegård J.* Systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2023;293(1):48–62. DOI: 10.1111/joim.13557.
 53. *Fang F, Xiao C, Li C, Liu X, Li S.* Tuning macrophages for atherosclerosis treatment. *Regen Biomater.* 2022;10:rbac103. DOI: 10.1093/rb/rbacC103.
 54. *Zhao L, Zhang Q, Feng Z, Zhang J, He F.* Serum amyloid A-to-albumin ratio as a potential biomarker to predict the activity, severity, and poor prognosis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(3):e24282. DOI: 10.1002/jcla.24282.
 55. *Shridas P, Tannock LR.* Role of serum amyloid a in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2019;30(4):320–5. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000616.
 56. *Shao B, Cavigliolo G, Brot N, Oda MN, Heinecke JW.* Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(34):12224–9. DOI: 10.1073/pnas.0802025105.
 57. *Bauer R, Brüne B, Schmid T.* Cholesterol metabolism in the regulation of inflammatory responses. *Front Pharmacol.* 2023;14:1121819. DOI: 10.3389/fphar.2023.1121819.
 58. *Skaggs BJ, Hahn BH, Sahakian L, Grossman J, McMahon M.* Dysfunctional, pro-inflammatory HDL directly upregulates monocyte PDGFR β , chemotaxis and TNF α production. *Clin Immunol.* 2010;137(1):147–56. DOI: 10.1016/j.clim.2010.06.014.
 59. *Ganjali S, Shirmohammadi L, Read MI, Sahebkar A.* High-density lipoprotein functionality in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(4):769–75. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2020.05.011.
 60. *Hardoňová M, Šiarnik P, Siváková M, Suchá B, Vlček M, Imrich R et al.* Autonomic nervous system function in newly diagnosed multiple sclerosis: association with lipid levels and insulin resistance. *Physiol Res.* 2021;70(6):875–82. DOI: 10.33549/physiolres.934695.
 61. *Pineda-Torra I, Siddique S, Waddington KE, Farrell R, Jury EC.* Disrupted lipid metabolism in multiple sclerosis: a role for liver X receptors? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:639757. DOI: 10.3389/fendo.2021.639757.
 62. *Cozzani E, Rosa GM, Burlando M, Parodi A.* Psoriasis as a cardiovascular risk factor: updates and algorithmic approach. *G Ital Dermatol Venereol.* 2018;153(5):659–65. DOI: 10.23736/S0392-0488.18.06040-6.
 63. *Nowowiejska J, Baran A, Flisiak I.* Aberrations in lipid expression and metabolism in psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6561. DOI: 10.3390/ijms22126561.

Информация об авторах

Анастасия Ильинична Богатырева – младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Юлия Владимировна Маркина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Таисия Владимировна Толстик – младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Татьяна Владимировна Кириченко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александр Михайлович Маркин – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Anastasia I. Bogatyreva – Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-1188-1945>

Yuliya V. Markina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-3781-6340>

Taisiya V. Tolstik – Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-2897-4777>

Tatiana V. Kirichenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-2899-9202>

Alexander M. Markin – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-6649-7924>

Гиперплазия эндометрия и микросателлитная нестабильность: возможности прогнозирования опухолевой трансформации эндометрия

Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова, Е.Е. Воропаева, А.В. Затворницкая

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

Резюме. *Введение.* Микросателлитная нестабильность приводит к появлению неоантигенов, которые играют ключевую роль в онкогенезе. Учитывая несомненный вклад микросателлитной нестабильности в развитие онкопатологии, представляется актуальным определение микросателлитной нестабильности как маркера опухолевой трансформации, в том числе при гиперплазии эндометрия, признанной предопухолевым процессом. Цель исследования – разработка модели прогнозирования риска опухолевой трансформации эндометрия при его гиперплазии на основе оценки микросателлитной нестабильности.

Материалы и методы. Исследование имеет дизайн одномоментного нерандомизированного ретроспективного с использованием гистологических, иммуногистохимических, статистических методов. Исследование было разделено на два этапа. На первом этапе выполняли сравнительный анализ особенностей микросателлитной нестабильности при гиперплазии и эндометриоидной карциноме эндометрия для разработки модели с целью определения риска опухолевой трансформации при данной патологии. На втором этапе осуществляли валидацию разработанной модели прогноза опухолевой трансформации гиперплазии эндометрия.

Результаты. Слизистая оболочка матки при гиперплазии эндометрия с атипией статистически значимо отличается более низкой экспрессией MLH1, PMS2, MSH6 по сравнению с эндометрием женщин с гиперплазией эндометрия без атипии и более высокой экспрессией MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 по сравнению с эндометрием пациенток с эндометриоидной карциномой. Данные о возрасте пациенток и уровне экспрессии MSH6 и MLH1 послужили основой для разработки модели расчета риска онкотрансформации, чувствительность которой составила 92,9% и специфичность 92,3%.

Заключение. Разработанную модель риска онкотрансформации целесообразно использовать при определении тактики ведения пациенток с гиперплазией эндометрия.

Ключевые слова: микросателлитная нестабильность, гиперплазия эндометрия, эндометриоидная карцинома

Для корреспонденции: Евгений Леонидович Казачков. E-mail: doctorkel@yandex.ru

Для цитирования: Казачков Е.Л., Казачкова Э.А., Воропаева Е.Е., Затворницкая А.В. Гиперплазия эндометрия и микросателлитная нестабильность: возможности прогнозирования опухолевой трансформации эндометрия. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):14–22. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.14-22.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 27.01.2023. Получена после рецензирования 20.02.2023. Принята в печать 10.04.2023.

Endometrial hyperplasia and microsatellite instability: possibilities for predicting tumor transformation of the endometrium

E.L. Kazachkov, E.A. Kazachkova, E.E. Voropaeva, A.V. Zatvornitskaya

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Abstract. *Introduction.* Microsatellite instability leads to the appearance of neoantigens, which play a key role in oncogenesis. Given the contribution of microsatellite instability to the development of oncopathology, it seems relevant to define microsatellite instability as a marker of malignant transformation in endometrial hyperplasia, which is recognized as a precancerous process. The aim of the study was to develop a model for predicting the risk of malignant transformation of the endometrium in its hyperplasia based on the tumor microsatellite instability.

Materials and methods. We performed a two-stage non-randomized retrospective study using histological, immunohistochemical, and statistical methods. In stage 1, a comparative analysis of the structural features of microsatellite instability in endometrial hyperplasia and the development of a model were performed to determine the risk of tumor transformation. In stage 2, we validated the developed model for the prediction of malignant transformation of endometrial hyperplasia.

Results. Samples of endometrial hyperplasia with atypia and endometrial hyperplasia without atypia are characterized by a significantly lower expression of MLH1, PMS2, and MSH6 in relation to normal endometrial samples. The expression of these genes was at a significantly higher level in endometrial samples collected from endometrioid adenocarcinoma. The data on the patients' age and the average area of immunopositive structures in relation to MMR antigens (i.e., MSH6 and MLH1) formed the basis for the development of a model for calculating the risk of oncogenic transformation. The sensitivity and specificity were 92.9% and 92.3%, respectively.

Conclusion. The developed model of oncogenic transformation risk can be used to determine the management options of patients with endometrial hyperplasia.

Keywords: microsatellite instability, endometrial hyperplasia, endometrial adenocarcinoma

Corresponding author: Evgeny L. Kazachkov. E-mail: doctorkel@yandex.ru

For citation: Kazachkov E.L., Kazachkova E.A., Voropaeva E.E., Zatzornitskaya A.V. Endometrial hyperplasia and microsatellite instability: possibilities for predicting tumor transformation of the endometrium. Clin. exp. morphology. 2023;12(4):14–22 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.14-22.

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

Received 27.01.2023. **Received in revised form** 20.02.2023. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Согласно данным мировой статистики, рак эндометрия занимает 6-е место в структуре злокачественных новообразований у женщин, а в структуре смертности находится на 14-м месте. В России заболеваемость раком эндометрия прочно удерживает 3-е место (7,8%) после рака молочной железы и злокачественных новообразований кожи и 9-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований [1].

Микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) играет ключевую роль в патогенезе опухолей [2]. MSI – фенотип, характеризующийся повышенной вероятностью возникновения мутаций в результате нарушения системы репарации ошибочно спаренных оснований ДНК. В результате нарушения репарации в клетках возникают накопления ошибок при репликации ДНК, что приводит к появлению новых микросателлитных повторов [3]. Микросателлиты представляют собой короткие повторы из последовательностей 1–6 нуклеотидов. В нормальных тканях за распознавание и восстановление изменений в повторяющихся последовательностях ДНК, возникающих в процессе репликации, отвечает система репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (mismatch repair system, MMR), представленная генами *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, кодирующими соответствующие белки [4, 5]. Опухоли, несущие дефектную систему MMR, характеризуются изменением длины микросателлитов. Это явление называется MSI, приводит к появлению неоантигенов, известных также как пептиды сдвига рамки считывания [6], которые играют ключевую роль в онкогенезе.

Учитывая несомненный вклад MSI в развитие эндометриодной карциномы [7, 8], рака желудка [9, 10],

толстой кишки [11], щитовидной железы [12], молочной железы [13], поджелудочной железы [14], представляется актуальным определение MSI как маркера опухолевой трансформации, в том числе при гиперплазии эндометрия (ГЭ), признанной предопухолевым процессом.

Цель исследования – разработка модели прогнозирования риска опухолевой трансформации эндометрия при его гиперплазии на основе изучения микросателлитной нестабильности.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе гинекологического отделения Областного перинатального центра, кафедре патологической анатомии и судебной медицины Южно-Уральского государственного медицинского университета Минздрава России и ее клинической базе – Челябинском областном патологоанатомическом бюро.

Проведен анализ медицинской документации: медицинские карты больных, получающих помощь в амбулаторных условиях (форма № 025/у), медицинские карты стационарных больных (форма № 003/у), протоколы прижизненных патологоанатомических исследований биопсийного (операционного) материала (форма № 014-1/у).

В соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» (2008) все пациентки были ознакомлены с целью работы и дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати. План исследования одобрен этическим комитетом ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 24.02.2021).

На основании результатов гистологического исследования биоптатов эндометрия были отобраны пациентки и сформированы группы. Исследование разделено на два этапа. На первом этапе выполняли сравнительный анализ особенностей MSI при ГЭ без атипии, с атипической ГЭ и эндометриоидной аденокарциномой, а также разработку модели с целью определения риска опухолевой трансформации при ГЭ. Для этого были отобраны 90 пациенток. В I группу вошли 30 пациенток, у которых при гистологическом исследовании биоптатов эндометрия выявлена ГЭ без атипии; во II группу – 30 женщин с ГЭ с атипией; в III группу – 30 женщин с эндометриоидной аденокарциномой эндометрия высокой (G1) и умеренной (G2) степени дифференцировки. На втором этапе осуществляли валидацию разработанной модели прогноза опухолевой трансформации ГЭ. Принимая во внимание тот факт, что онкотрансформация ГЭ может занимать временной промежуток до 15 лет [7], исследование выполнено ретроспективно. На основании анализа медицинской документации были отобраны 40 пациенток, разделенных на две группы: в группу А вошли 20 пациенток, у которых при гистологическом исследовании образцов эндометрия диагностирована ГЭ без атипии, в группу Б – 20 женщин с ГЭ с атипией.

Исследование имеет дизайн одномоментного нерандомизированного ретроспективного с использованием гистологических, иммуногистохимических, статистических методов. Критерии включения: информированное согласие на участие в исследовании, возраст пациенток от 18 до 65 лет, морфологически подтвержденный диагноз «гиперплазия эндометрия» (для групп I и II на первом этапе исследования, А и Б – на втором этапе) или «эндометриоидная карцинома» (для группы III), отсутствие гормональной терапии, включая комбинированные оральные контрацептивы, гестагенные гормональные препараты и агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона, на протяжении последних шести месяцев. Критерии исключения: аденомиоз, миома матки, подлежащая хирургическому лечению, онкопатология других органов.

Образцы эндометрия получены с помощью мануальной вакуумной аспирации под контролем гистероскопии. Анализ биоптатов слизистой оболочки матки выполняли по общепринятым критериям [15], изучали особенности строения железистого и стромального компонентов эндометрия пациенток исследуемых групп, уточняли степень дифференцировки эндометриоидной карциномы. Гистологические препараты готовили по стандартным методикам. Из парафиновых блоков на микротоме Microm Ergostar HM 200 (MICROM International, Германия) с системой переноса срезов изготавливали срезы толщиной 5 мкм (не менее двух срезов с каждого блока). Депарафинизированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону для оценки состояния волокнистого компонента стромы

эндометрия. Обзорную микроскопию железистого и стромального компонентов эндометрия выполняли с использованием микроскопа Axio Lab. A1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистохимическое окрашивание проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Ventana Benchmark xt (Ventana Medical Systems S.A., Франция) с использованием готовых к применению (predilute ready-to-use) мышиных моноклональных антител (МКАТ). Экспрессию исследуемых антигенов в эндометрии выявляли с помощью МКАТ к MLH1 (клон G168-728, Cell Marque, США), MSH2 (клон G219-1129, Cell Marque, США), MSH6 (клон 44, Cell Marque, США), PMS2 (клон MRQ-28, Cell Marque, США). Оценка уровня экспрессии маркеров была основана на определении площади коричневого окрашивания ядер и цитоплазмы клеток в железистом компоненте на всей площади среза. Для автоматического подсчета позитивно окрашенных клеток были выполнены электронные копии (сканы) микропрепаратов с применением сканирующего микроскопа с технологией ускоренного сканирования и высоким качеством изображения гистологических препаратов Panoramic 250 (3D Histech, Венгрия). Полученные сканы проанализированы с использованием свободно распространяемого программного обеспечения для цифрового анализа изображений QuPath (<https://qupath.github.io>) и применением нейросетевого алгоритма Pixel Classifier при помощи модуля расчета Positive cell detection на всей площади микропрепарата.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли в программе Statistica 13 (StatSoft, США) [16]. Показатели уровня экспрессии исследуемых антигенов (площадь иммунопозитивных структур железистого компонента эндометрия) представляли как медиану, нижний и верхний квартили (Q1; Q3). Сравнение между двумя группами проводили с помощью непараметрических статистических методов с использованием критерия Манна–Уитни; для сравнения в более чем двух независимых группах применяли критерий Краскела–Уоллиса. При оценке качественных показателей вычисляли фактические и процентные частоты наблюдений (n, %). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Для исследования корреляции нескольких независимых переменных и одной зависимой применяли метод бинарной логистической регрессии. Вероятность онкотрансформации при ГЭ рассчитывали по формуле:

$$p = \exp(y) / [1 + \exp(y)],$$

где p – вероятность, что событие произойдет;

y – стандартное уравнение регрессии:

$y = b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_n \times X_n + B_0$; при этом $X_1 \dots X_n$ – значения независимых переменных, $b_1 \dots b_n$ – коэффициенты, расчет которых является задачей бинарной

логистической регрессии, B_0 – некоторая константа (свободный коэффициент).

С одной стороны, построенная бинарная регрессионная модель позволяет выявить значимые факторы, влияющие на течение заболевания, с другой стороны – прогнозировать у конкретной пациентки вероятность развития заболевания путем распределения по группам факторов риска.

Для разработки прогностической модели риска онкотрансформации при ГЭ использовали систему управления базами данных Microsoft Access (Microsoft, США).

Результаты

На первом этапе исследования было установлено, что медиана возраста пациенток с ГЭ без атипии (I группа) составила 40 лет (35,5; 47), с ГЭ с атипией (II группа) – 51 год (48,5; 55,5), с эндометриоидной карциномой – 62 года (60; 63,5). Следует отметить, что среди пациенток с ГЭ без атипии статистически значимо реже встречались женщины старше 45 лет (12 случаев, 40%) по сравнению с пациентками с ГЭ с атипией и эндометриоидной карциномой, которые в 100% случаев были старше 45 лет.

Большинство пациенток с ГЭ как без атипии, так и с атипией, а также эндометриоидной карциномой предъявляли жалобы на аномальные маточные кровотечения. При изучении клинико-анамнестических особенностей пациенток было установлено, что в соматическом анамнезе женщин всех групп присутству-

ют заболевания сердечно-сосудистой и эндокринной систем, при которых создаются условия для формирования относительной гиперэстрогении. Для гинекологического анамнеза пациенток с ГЭ (I и II группы) и эндометриоидной карциномой (III группа) характерно наличие миомы матки и доброкачественных заболеваний молочных желез. Кроме того, пациенток всех групп отличало присутствие воспалительных заболеваний органов малого таза, активирующих пролиферативную активность железистого и стромального компонентов гиперплазированного эндометрия и создающих благоприятные условия для атипической трансформации клеток.

Анализ результатов иммуногистохимического исследования показал, что уровень экспрессии MLH1 в железистом компоненте эндометрия пациенток с ГЭ без атипии составил 70,0 (34,5; 77,3) (рис. 1 А), женщин с атипической ГЭ – 44,6 (19,5; 55,3) (рис. 1 В), пациенток с эндометриоидной карциномой – 2,3 (0,0; 22,3) (рис. 1 С).

Уровень экспрессии PMS2 в железистом компоненте эндометрия пациенток группы I равнялся 67,4 (54,0; 75,9) (рис. 2 А), пациенток группы II – 39,2 (31,8; 43,1) (рис. 2 В), пациенток группы III – 7,8 (0,0; 13,6) (рис. 2 С).

Уровень экспрессии MSH2 в железистом компоненте эндометрия пациенток с ГЭ без атипии составил 41,8 (24,9; 62,1) (рис. 3 А), женщин с атипической ГЭ – 38,5 (27,0; 49,3) (рис. 3 В), пациенток с эндометриоидной карциномой – 15,6 (0,0; 21,6) (рис. 3 С).



Рис. 1. Экспрессия MLH1 в слизистой оболочке матки при гиперплазии эндометрия без атипии (А), гиперплазии эндометрия с атипией (В), эндометриоидной карциноме (С). ИГХ окрашивание с антителами к MLH1, $\times 200$

Fig. 1. MLH1 expression in the uterine mucosa in endometrial hyperplasia without atypia (A), endometrial hyperplasia with atypia (B), endometrioid adenocarcinoma (C). IHC assay with antibodies to MLH1, $\times 200$



Рис. 2. Экспрессия PMS2 в слизистой оболочке матки при гиперплазии эндометрия без атипии (А), гиперплазии эндометрия с атипией (В), эндометриоидной карциноме (С). ИГХ окрашивание с антителами к PMS2, $\times 200$

Fig. 2. PMS2 expression in the uterine mucosa in endometrial hyperplasia without atypia (A), endometrial hyperplasia with atypia (B), endometrioid adenocarcinoma (C). IHC assay with antibodies to PMS2, $\times 200$

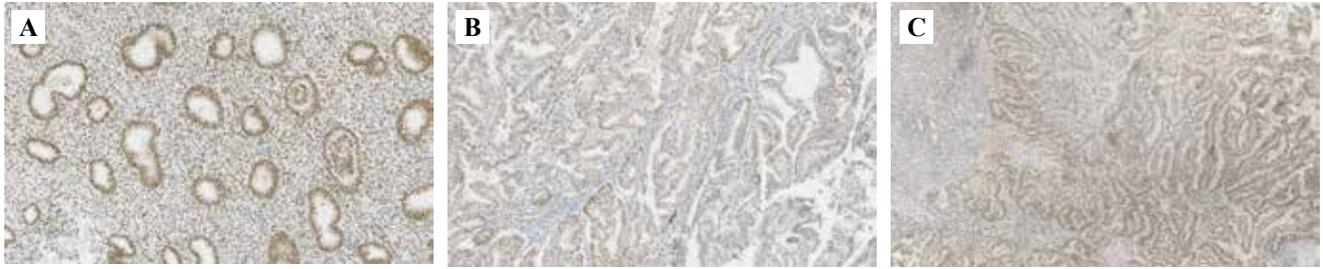


Рис. 3. Экспрессия MSH2 в слизистой оболочке матки при гиперплазии эндометрия без атипии (А), гиперплазии эндометрия с атипией (В), эндометриоидной карциноме (С). ИГХ окрашивание с антителами к MSH2, $\times 200$

Fig. 3. MSH2 expression in the uterine mucosa in endometrial hyperplasia without atypia (A), endometrial hyperplasia with atypia (B), endometrioid adenocarcinoma (C). IHC assay with antibodies to MSH2, $\times 200$

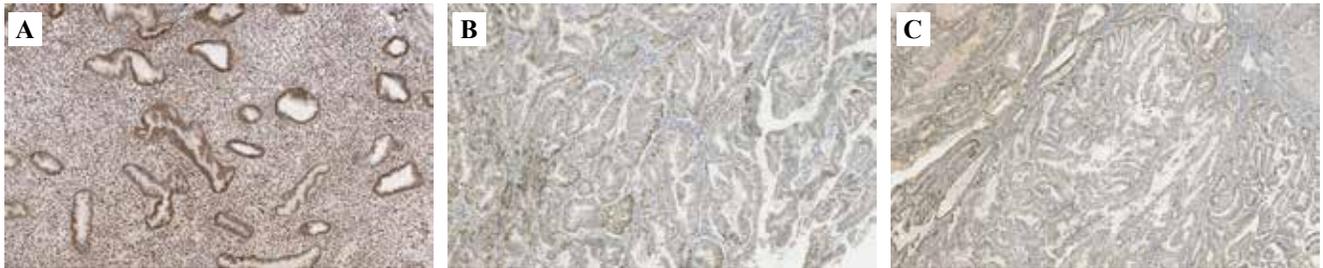


Рис. 4. Экспрессия MSH6 в слизистой оболочке матки при гиперплазии эндометрия без атипии (А), гиперплазии эндометрия с атипией (В), эндометриоидной карциноме (С). ИГХ окрашивание с антителами к MSH6, $\times 200$

Fig. 4. MSH6 expression in the uterine mucosa in endometrial hyperplasia without atypia (A), endometrial hyperplasia with atypia (B), endometrioid adenocarcinoma (C). IHC assay with antibodies to MSH6, $\times 200$

Уровень экспрессии MSH6 в железистом компоненте эндометрия пациенток группы I был равным 87,2 (61,3; 92,9) (рис. 4 А), пациенток группы II – 54,9 (50,5; 59,1) (рис. 4 В), пациенток группы III – 11,2 (0,0; 21,6) (рис. 4 С).

Таким образом, по результатам иммуногистохимического исследования эндометрия пациенток с ГЭ с атипией в железистом компоненте выявлена статистически значимо более низкая экспрессия MLH1 ($p_{1,2}=0,03$), PMS2 ($p_{1,2}=0,03$), MSH6 ($p_{1,2}<0,01$) по сравнению с эндометрием пациенток с ГЭ без атипии. При этом уровень экспрессии MLH1 ($p_{1,3}<0,01$, $p_{2,3}<0,01$), PMS2 ($p_{1,3}<0,01$, $p_{2,3}=0,01$), MSH2 ($p_{1,3}=0,01$, $p_{2,3}<0,01$), MSH6 ($p_{1,3}<0,01$, $p_{2,3}<0,01$) в эндометрии пациенток с ГЭ (I и II группы) был статистически значимо выше, чем в эндометрии женщин с эндометриоидной карциномой.

Для создания модели расчета риска онкотрансформации выполнен автоматический пошаговый регрессионный анализ в пакете Statistica 13 с включением в модель факторных переменных, к которым относились возраст пациенток, клиничко-anamнестические характеристики, результаты гистологического и иммуногистохимического исследований образцов эндометрия.

В нашем случае решение получено на четвертом шаге, при этом в модель были включены четыре фактора: экспрессия MSH6 и MLH1, возраст пациентки и принадлежность к возрастной группе старше 45 лет.

С учетом полученного регрессионного уравнения формула для расчета риска онкотрансформации при ГЭ принимает вид:

$$p = \exp(0,26 - 0,009 \times a - 0,43 \times b + 0,018 \times c - 0,002 \times d) / [1 + \exp(0,26 - 0,009 \times a - 0,43 \times b + 0,018 \times c - 0,002 \times d)],$$

где a – величина экспрессии MLH6;

b – принадлежность к возрастной группе старше 45 лет (бинарная величина, принимает значение 1 или 0);

c – возраст пациентки;

d – величина экспрессии MLH1.

Эти показатели были использованы в системе управления базами данных Microsoft Access, что позволило разработать модель прогнозирования риска опухолевой трансформации эндометрия при его гиперплазии. Настоящая модель позволяет рассчитать величину риска онкотрансформации.

Для валидации разработанной программы выполнен второй этап исследования, в который были включены 40 пациенток, разделенных на две группы: группа А – 20 пациенток с ГЭ без атипии и группа Б – 20 пациенток с ГЭ с атипией. Медиана возраста пациенток группы А составила 38 лет (36,5; 39), группы Б – 51 год (48; 52).

В обеих группах проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование образцов эндометрия с расчетом медианы площади MSH6 и MLH1 иммунопозитивных клеток в структурах на всей по-

верхности среза, по результатам которого у пациенток группы А уровень экспрессии MSH6 составил 79,5 (77,6; 82,3), а MLH1 – 39,1 (36,5; 42,3). В группе Б уровень экспрессии MSH6 составил 56,4 (53,4; 58,2), а для MLH1 – 43,1 (41,9; 45,3).

Данные о возрасте пациенток и площади MSH6 и MLH1 иммунопозитивных клеток в железистых структурах эндометрия были обработаны с помощью разработанной модели. В группе пациенток с ГЭ без атипии (группа А) у трех пациенток (15%) зарегистрирован риск онкотрансформации выше 70%. При динамическом наблюдении данных пациенток в течение 10 лет эндометриоидная карцинома развилась в двух случаях (истинно положительный результат), в одном случае риск онкотрансформации не реализовался (ложно положительный результат). У 17 пациенток (85%) риск онкотрансформации был менее 70% и, согласно данным медицинской документации, он не реализовался с течением времени, за прошедшие 10 лет (истинно отрицательный результат).

В группе с ГЭ с атипией (группа Б) у 12 пациенток (60%) риск онкотрансформации превышал 70%, при этом он реализовался у 11 пациенток (истинно положительный результат), в одном случае эндометриоидная карцинома в динамике зарегистрирована не была. У восьми женщин (40%) риск онкотрансформации был менее 70% (от 15 до 65%) и реализовался лишь в одном случае (при расчете риска 56%) – данный результат расценен как ложно отрицательный, у семи пациенток эндометриоидная карцинома зарегистрирована в динамике не была (истинно отрицательный результат).

Результаты проведенной валидации разработанной модели в обеих группах суммированы и представлены в таблице.

Таким образом, результаты валидации свидетельствуют о том, что диагностическая чувствительность ($A / (A + C)$) разработанной программы расчета риска малигнизации составляет 92,9% ($13 / (13 + 1) = 0,929$), диагностическая специфичность ($D / (B + D)$) – 92,3% ($24 / (2 + 24) = 0,923$). Высокие чувствительность и специфичность данной программы позволяют рассмотреть возможность ее внедрения при выборе тактики ведения пациенток с ГЭ, в том числе в случае подбора гормональной терапии и решения вопроса об оперативном лечении.

Обсуждение

На основании результатов проведенного исследования установлено, что абсолютное большинство пациенток с ГЭ как без атипии, так и с атипией, а также эндометриоидной карциномой предъявляют жалобы на аномальные маточные кровотечения. Выявленные клинико-anamnestические особенности пациенток с ГЭ и эндометриоидной карциномой согласуются с результатами исследований других авторов [14–23]. Так, по нашим данным, соматический анамнез пациенток с указанной выше патологией отличается присутствием заболеваний сердечно-сосудистой и эндокринной систем. В работах отечественных ученых Г.М. Савельевой и соавт. [17] акцентируется внимание на высокой степени риска развития рака эндометрия при ГЭ на фоне сахарного диабета, артериальной гипертензии и ожирения. При данной соматической патологии создаются условия для увеличения концентрации эстрогена и фракции доступного эстрадиола, а следовательно, формируется относительная гиперэстрогения. Согласно исследователям, лечащему врачу при наличии названных сопутствующих соматических заболеваний

Таблица | Table

Оценка чувствительности и специфичности разработанной модели оценки риска онкотрансформации при гиперплазии эндометрия | Sensitivity and specificity evaluation of the developed model for assessing the oncogenic transformation risk of endometrial hyperplasia

Показатель Indicator		Результаты обследования согласно данным медицинской документации (наличие онкотрансформации) The examination results according to the medical documentation data (oncogenic transformation presence)		
		болезнь есть presence of the disease	болезни нет no disease	всего total
Результаты применения разработанной модели (расчет риска онкотрансформации) The results of the developed model (calculation of the oncogenic transformation risk)	болезнь есть presence of the disease	A = 13	B = 2	A + B = 15
		Истинно положительный результат True positive result	Ложно положительный результат False positive result	
	болезни нет no disease	C = 1	D = 24	C + D = 25
		Ложно отрицательный результат False negative result	Истинно отрицательный результат True negative result	
Всего Total		A + C = 14	B + D = 26	A + B + C + D = 40

необходимо относиться к ГЭ как к предраковому процессу [18]. Для гинекологического анамнеза характерно присутствие миомы матки и доброкачественных заболеваний молочных желез. Абсолютная или относительная гиперэстрогения, которая сопровождает эти состояния, приводит к избыточному влиянию эстрогенов на клетки эндометрия при отсутствии антипролиферативного действия прогестерона и снижении окисления кортизола, следствием чего является ГЭ [19]. Кроме того, пациенток всех групп отличает присутствие воспалительных заболеваний органов малого таза. Длительное хроническое воспаление приводит к межклеточным и стромально-паренхиматозным нарушениям, следствием чего является активация процессов склерозирования и неоангиогенеза, которые стимулируют пролиферацию клеток и приводят к прогрессированию гиперплазии. Воспаление активирует пролиферативную активность железистого и стромального компонентов гиперплазированного эндометрия и создает благоприятные условия для атипичной трансформации клеток [20, 21].

Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов эндометрия пациенток с ГЭ с атипией свидетельствуют о статистически значимо более низкой экспрессии маркеров MSI (MLH1, PMS2, MSH6) в железистом компоненте эндометрия по сравнению с образцами эндометрия пациенток с ГЭ без атипии. Вместе с тем уровень экспрессии изучаемых маркеров (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) в железистых структурах эндометрия пациенток с ГЭ (I и II группы) статистически значимо выше, чем в эндометрии женщин с эндометриодной карциномой. И если результаты исследования изменений MSI при раке эндометрия освещены в литературе [22, 23], то ряд вопросов, касающихся экспрессии маркеров MSI при гиперпластических процессах эндометрия, до сих пор остается открытым. Отмеченные особенности MSI в железистом компоненте эндометрия при ГЭ, прежде всего ГЭ с атипией, свидетельствуют о наличии дефектной системы MMR при данной патологии, что является причиной появления пептидов сдвига рамки считывания, которые, возможно, вносят вклад в онкотрансформацию эндометрия при его гиперплазии.

Данные о клинико-анамнестических особенностях пациенток изучаемых групп и иммуногистохимических характеристиках эндометрия позволили разработать модель расчета риска онкотрансформации, которую можно использовать при определении тактики ведения пациенток с ГЭ.

Заключение

Установлено, что эндометрий при гиперплазии с атипией статистически значимо отличается более низкой экспрессией MLH1, PMS2, MSH6 в железистых структурах по сравнению с эндометрием женщин с гиперплазией эндометрия без атипии и более высокой экспрессией MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 в железистом

компоненте эндометрия в сравнении с эндометрием пациенток с эндометриодной карциномой. Данные о возрасте пациенток и уровне экспрессии MSH6 и MLH1 послужили основой для разработки модели расчета риска онкотрансформации эндометрия, чувствительность которой составила 92,9% и специфичность 92,3%. Иммуногистохимическое исследование образцов эндометрия при его гиперплазии для оценки микросателлитной нестабильности, значимость и степень информативности разработанной программы свидетельствуют о целесообразности использования данной модели при определении тактики ведения пациенток с гиперплазией эндометрия.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова, Е.Е. Воропаева, А.В. Затворницкая. Сбор и обработка материала – Е.Л. Казачков, А.В. Затворницкая. Написание текста – А.В. Затворницкая. Редактирование – Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.L. Kazachkov, E.A. Kazachkova, E.E. Voropaeva, A.V. Zatzornitskaya. Collected the data and performed the analysis – E.L. Kazachkov, A.V. Zatzornitskaya. Wrote the paper – A.V. Zatzornitskaya. Edited the manuscript – E.L. Kazachkov, E.A. Kazachkova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2021. 252 с. AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). Malignant neoplasms in Russia in 2020 (incidence and mortality). Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2021. 252 p. (In Russ.).
2. Сычевская К.А., Кравченко С.К., Рисинская Н.В., Мисюрин А.Е., Никулина Е.Е., Бабаева Ф.Э. и др. Микросателлитная нестабильность (MSI, EMAS) в патогенезе фолликулярной лимфомы. Онкогематология. 2021;16(2):56–69. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-56-59. Sychevskaya KA, Kravchenko SK, Risinskaya NV, Misyurina AE, Nikulina EE, Babaeva FE et al. Microsatellite instability (MSI, EMAS) in the pathogenesis of follicular lymphoma. Onkogematologiya = Oncohematology. 2021;16(2):56–69 (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-56-59.
3. Amato M, Franco R, Facchini G, Addeo R, Ciardiello F, Berretta M et al. Microsatellite instability: from the implementation of the detection to a prognostic and predictive role in cancers. Int J Mol Sci. 2022;23(15):8726. DOI: 10.3390/ijms23158726.
4. Мусаев А.А., Назаров В.Д., Будникова А.С., Лапин С.В., Воробьев С.Л., Эмануэль В.Л. и др. Клинико-морфологи-

- ческий портрет опухолей с микросателлитной нестабильностью. Успехи молекулярной онкологии. 2021;8(2):52–59. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-52-59.
- Musaelyan AA, Nazarov VD, Budnikova AS, Lapin SV, Vorobyev SL, Emanuel VL et al.* Clinical and morphological portrait of tumors with microsatellite instability. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in molecular oncology.* 2021;8(2):52–59 (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-52-59.
5. *Fanale D, Corsini LR, Scalia R, Brando C, Cucinella A, Madonia G et al.* Can the tumor-agnostic evaluation of MSI/MMR status be the common denominator for the immunotherapy treatment of patients with several solid tumors? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022;170:103597. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103597.
 6. *Olave MC, Graham RP.* Mismatch repair deficiency: the what, how and why it is important. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022;61(6):314–21. DOI: 10.1002/gcc.23015.
 7. *Guo YE, Liu Y, Zhang W, Luo H, Shu P, Chen G et al.* The clinicopathological characteristics, prognosis and immune microenvironment mapping in MSI-H/MMR-D endometrial carcinomas. *Discov Oncol.* 2022;13(1):12. DOI: 10.1007/s12672-022-00466-5.
 8. *Turinetto M, Lombardo V, Pisano C, Musacchio L, Pignata S.* Pembrolizumab as a single agent for patients with MSI-H advanced endometrial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2022;22(10):1039–47. DOI: 10.1080/14737140.2022.2126356.
 9. *Мусаелян А.А., Оганян К.А., Назаров В.Д., Лапин С.В., Орлов С.В.* Микросателлитная нестабильность при раке желудка: основы и клиническое применение. Эффективная фармакотерапия. 2021;30(17):12–17. DOI:10.33978/2307-3586-2021-17-30-12-17.

Musaelyan AA, Oganyan KA, Nazarov VD, Lapin SV, Orlov SV. Microsatellite instability in gastric cancer: fundamentals and clinical applications. *Effective pharmacotherapy.* 2021;30(17):12–17 (In Russ.). DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-30-12-17.

 10. *Cai L, Sun Y, Wang K, Guan W, Yue J, Li J et al.* The better survival of MSI subtype is associated with the oxidative stress related pathways in gastric cancer. *Front Oncol.* 2020;10:1269. DOI: 10.3389/fonc.2020.01269.
 11. *Lin A, Zhang J, Luo P.* Crosstalk between the MSI status and tumor microenvironment in colorectal cancer. *Front Immunol.* 2020;11:2039. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02039.
 12. *Zhu Y, Yu T, Huang J, Ma X, Shen T, Li A et al.* Development and validation of prognostic m6A-related lncRNA and mRNA model in thyroid cancer. *Am J Cancer Res.* 2022;12(7):3259–79. PMID: 35968348.
 13. *Кузнецова О.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Виноградов М.И., Шомова М.В., Франк Г.А.* Иммуногистохимическое исследование маркеров MSI при раке молочной железы. Архив патологии. 2021;83(1):12–17. DOI: 10.17116/patol20218301112.

Kuznetsova OA, Zavalishina LE, Andreeva YY, Vinogradov MI, Shomova MV, Frank GA. Immunohistochemical study of MSI markers in breast cancer. *Arkhiv Patologii = Archive of Pathology.* 2021;83(1):12–17 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20218301112.

 14. *Chakrabarti S, Bucheit L, Starr JS, Innis-Shelton R, Shergill A, Dada H et al.* Detection of microsatellite instability-high (MSI-H) by liquid biopsy predicts robust and durable response to immunotherapy in patients with pancreatic cancer. *J Immunother Cancer.* 2022;10(6):e004485. DOI: 10.1136/jitc-2021-004485.
 15. *Кондриков Н.И., Баранова И.В.* Патология матки: Руководство для врачей. 2-е изд. Москва: Практическая медицина, 2019. 352 с.

Kondrikov NI, Baranova IV. Pathology of the uterus: Guide for physicians. 2nd ed. Moscow: Practical Medicine, 2019. 352 p. (In Russ.).

 16. *Зубов Н.Н., Кувакин В.И., Умаров С.З.* Биомедицинская статистика: информационные технологии анализа данных в медицине и фармации: Учебное пособие. Москва: КноРус, 2021. 466 с.

Zubov NN, Kuvakin VI, Umarov SZ. Biomedical statistics: information technologies of data analysis in medicine and pharmacy: Textbook. Moscow: KnoRus, 2021. 466 p. (In Russ.).

 17. Г.М. Савельева, Г.Т. Сухих, В.Н. Серов, В.Е. Радзинский, И.Б. Манухин (ред.). Гинекология: Национальное руководство. 2-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 1008 с.

GM Savelyeva, GT Sukhikh, VN Serov, VE Radzinsky, IB Manukhin (eds.). Gynecology: National guideline. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2020. 1008 p.

 18. *Оразов М.Р., Краснополянская К.В., Михалева Л.М., Семенов П.А., Муллина И.А.* Алгоритм действий клинициста при гиперпластических процессах эндометрия. Трудный пациент. 2021;19(3):39–42. DOI: 10.224412/2074-1005-2021-3-39-42.

Orazov MR, Krasnopol'skaya KV, Mikhaleva LM, Semenov PA, Mullina IA. Algorithm of actions of a clinician in case of hyperplastic processes of the endometrium. *Trudnyj Pacient = Difficult Patient.* 2021;19(3):39–42 (In Russ.). DOI: 10.224412/2074-1005-2021-3-39-42.

 19. *Дорфман М.Ф., Гаспаров А.С., Пацан О.И., Саакян М.Г., Дорфман С.Ф.* Клинические и морфологические особенности простой и клеточной миомы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(1):16–24. DOI:10.31088/CEM2022.11.1.16-24.

Dorfman MF, Gasparov AS, Patsap OI, Sahakyan MG, Dorfman SF. Clinical and morphological features of simple and cellular fibroids. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(1):16–24 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.16-24.

 20. *Оразов М.Р., Михалева Л.М., Семенов П.А.* Хронический эндометрит: патогенез, диагностика, лечение и его связь с бесплодием. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(2):16–25. DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.16-25.

Orazov MR, Mikhaleva LM, Semenov PA. Chronic endometritis: pathogenesis, diagnosis, management and associated infertility. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(2):16–25 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.16-25.

 21. *Савельева Г.М., Бреусенко В.Г., Карева Е.Н., Голухов Г.Н., Гуторова Д.С., Овчинникова А.В. и др.* Новая стратегия поиска гормональной терапии пролиферативных процессов эндометрия у пациенток в постменопаузе. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2022;3:44–51. DOI: 10.24075/brsmu.2022.036.

Savelyeva GM, Breusenko VG, Kareva EN, Golukhov GN, Gutorova DS Ovchinnikova AV et al. A new strategy in selection of

- hormone therapy for endometrial proliferative process in postmenopausal patients. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2022;3:44–51 (In Russ.). DOI: 10.24075/brsmu.2022.036.
22. Румянцев А.А., Анохин А.Ю. Роль иммунотерапии в лечении метастатических и рецидивирующих новообразований женской репродуктивной системы. *Медицинский совет*. 2021;9:76–86. DOI 10.21518/2079-701X-2021-9-76-86. Rumyantsev AA, Anokhin AY. The role of immunotherapy in the management of metastatic/recurrent female reproductive system neoplasms. *Meditinskiy sovet = Medical Council*. 2021;(9):76–86 (In Russ.). DOI 10.21518/2079-701X-2021-9-76-86.
23. Королева Е.И., Мусаелян А.А., Назаров В.Д., Лапин С.В., Воробьев С.Л., Шарова О.Л. и др. Молекулярно-генетические особенности рака эндометрия и их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками. *Молекулярная медицина*. 2022;3(20):34–40. DOI: 10.29296/24999490-2022-03-05. Koroleva EI, Musaelyan AA, Nazarov VD, Lapin SV, Vorobev SL, Sharova OL. Molecular markers of endometrial carcinoma and associated clinicopathological features. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular medicine*. 2022;3(20):34–40 (In Russ.). DOI: 10.29296/24999490-2022-03-05.

Информация об авторах

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

Элла Алексеевна Казачкова – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии ЮУГМУ.

Екатерина Евгеньевна Воропаева – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Александра Вадимовна Затворницкая – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Author information

Evgeny L. Kazachkov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the V.L. Kovalenko Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-2008-7671>

Ella A. Kazachkova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-1175-4479>

Ekaterina E. Voropaeva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, V.L. Kovalenko Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-0800-3380>

Aleksandra V. Zatvornitskaya – Cand. Sci. (Med.), Assistant, V.L. Kovalenko Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9245-3749>

Молекулярно-генетические критерии малигнизации эпителия слизистой оболочки рта

А.А. Ивина^{1,2}, Ю.О. Тигай¹, О.Ф. Рабинович², В.А. Горячев¹, Д.Р. Фамилья Фриас¹, И.И. Бабиченко^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Введение. При обследовании слизистой оболочки рта (СОР), особенно при наличии в ней воспалительного процесса, не всегда видны начальные признаки малигнизации. На фоне воспалительного инфильтрата могут скрываться как доброкачественные изменения, такие как эпителиальная гиперплазия (ЭГ) и эпителиальная дисплазия (ЭД) разной степени выраженности, так и плоскоклеточный рак (ПР). Целью исследования стало изучение пролиферативной активности эпителиальных клеток СОР, экспрессии TERT и амплификации гена *TERC* теломеразы при развитии эпителиальной гиперплазии, дисплазии и ПР.

Материалы и методы. Для исследования сформированы четыре группы пациентов: 1-я группа – 16 пациентов (26,6%) с диагнозом «эпителиальная гиперплазия», 2-я группа – 16 пациентов (26,6%) с диагнозом «эпителиальная дисплазия низкой степени» (ЭДНС), 3-я группа – 13 человек (21,6%) с диагнозом «эпителиальная дисплазия высокой степени» (ЭДВС), 4-я группа – 15 (25%) с диагнозом «плоскоклеточный рак». Иммуногистохимические (ИГХ) и гистологические исследования проведены стандартным методом, оценивалась экспрессия к белку Ki-67 и активность теломеразы. FISH-исследование проводилось с применением ДНК-зондов LSP *TERC* и ССР3.

Результаты. Во всех исследуемых группах при ИГХ исследовании выявлены высокая пролиферация клеток и активность теломеразы. При изучении амплификации *TERC* участка РНК в третьей хромосоме методом FISH в 1-й группе амплификация практически отсутствовала и соотношение сигналов соответствовало 2:2 в 1,3% случаев, в остальных группах выявлялась амплификация гена *TERC*, во 2-й группе – в 83,9% случаев, в 3-й – в 97,3% и в 4-й – в 89,8%.

Заключение. Амплификация сигналов участка *TERC* в третьей хромосоме выявляется при озлокачествлении процесса, что может служить основным критерием для ранней диагностики малигнизации эпителия СОР.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак, эпителиальная дисплазия, амплификация *TERC*, теломераза

Для корреспонденции: Юлия Олеговна Тигай. E-mail: chen.juliya@gmail.com

Для цитирования: Ивина А.А., Тигай Ю.О., Рабинович О.Ф., Горячев В.А., Фамилья Фриас Д.Р., Бабиченко И.И. Молекулярно-генетические критерии малигнизации эпителия слизистой оболочки рта. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):23–31. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.23-31.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 28.06.2023. Получена после рецензирования 12.07.2023. Принята в печать 20.11.2023.

Molecular genetic criteria for oral mucosal epithelial malignization

A.A. Ivina^{1,2}, Yu.O. Tigay¹, O.F. Rabinovich², V.A. Goryachev¹, D.R. Familia Frias¹, I.I. Babichenko^{1,2}

¹ Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Central Research Institute of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. When examining the oral mucosa (OM) in the presence of an inflammatory process, the initial signs of malignancy are not always visible. Amid an inflammatory infiltrate, benign changes such as epithelial hyperplasia (EH), epithelial dysplasia (ED) of varying severity, and squamous cell carcinoma (SCC) can be hidden. The aim of the paper was to study the proliferative activity of epithelial cells of the OM, TERT expression, and amplification of telomerase *TERC* gene in the development of epithelial hyperplasia, dysplasia, and SCC.

Materials and methods. We divided 60 patients into four groups: Group 1 with EH (n=16, 26.6%); Group 2 with low-grade epithelial dysplasia (LGED) [n=16, 26.6%]; Group 3 with high-grade epithelial dysplasia (HGED) [n=13, 21.6%]; and Group 4 with SCC (n=15, 25%). IHC and histological studies were carried out using standard methods; expression to Ki-67 protein and telomerase activity were evaluated. The FISH method was used with LSP *TERC* and CCP3 DNA probes.

Results. High-cell proliferation and telomerase activity were revealed by IHC study in all groups. Amplification of *TERC* RNA site in chromosome 3 by FISH in Group 1 was almost absent and showed a 2:2 signal ratio in 1.3% of cases; in other groups, the amplification of *TERC* gene was positive: in groups 2, 3, and 4 it was in 83.9%, 97.3%, and 89.8% of cases, respectively.

Conclusion. Amplification of *TERC* site signals in chromosome 3 is detected during malignization which may be the main criterion for early diagnosis of malignization of OM epithelium.

Keywords: squamous cell carcinoma, epithelial dysplasia, *TERC* amplification, telomerase

Corresponding author: Yulia O. Tigay. E-mail: chen.juliya@gmail.com

For citation: Ivina A.A., Tigay Yu.O., Rabinovich O.F., Goryachev V.A., Familia Frias D.R., Babichenko I.I. Molecular genetic criteria for oral mucosal epithelial malignization. Clin. exp. morphology. 2023;12(4):23–31. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.23-31.

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

Received 28.06.2023. **Received in revised form** 12.07.2023. **Accepted** 20.11.2023.

Введение

В современном мире с каждым годом растет число онкологических заболеваний, включая рак головы и шеи, в связи с чем данная патология является одной из наиболее актуальных проблем в медицине. В 2021 году в Российской Федерации выявлено 580 415 новых случаев злокачественных новообразований. Прирост данного показателя по сравнению с 2020 годом составил 4,4% [1]. По оценкам Е.Н. Беляковой, в 2018 году в разных странах было зарегистрировано 705 078 новых случаев заболеваний и 358 144 случая смерти от рака головы и шеи [2].

Ш.Ф. Джураева и соавт. считают, что рак никогда не возникает в здоровом органе и что всякий рак имеет свой предрак [3]. По данным И.М. Семченко, любое предраковое состояние слизистой оболочки рта (СОР) под действием неблагоприятных факторов может подвергаться озлокачествлению [4]. Обследовать СОР удобно, но, несмотря на это, клинически не всегда возможно определить наличие злокачественного процесса. Под хроническим воспалением СОР могут скрываться как доброкачественные изменения – эпителиальная гиперплазия (ЭГ), эпителиальная дисплазия (ЭД) разной степени выраженности, так и плоскоклеточный рак (ПР). Неопластические изменения, а именно трансформация ЭД в ПР, в настоящее время изучены недостаточно [5].

Прогноз для пациентов с ПР СОР остается неблагоприятным, агрессивность ПР заключается в его инвазивном росте и метастазировании в региональные лимфатические узлы. Пятилетняя выживаемость у пациентов с ПР СОР без метастазов в шейных лимфатических узлах составляет 75%, а у пациентов с метастазами в одном, двух или трех лимфатических узлах и более – 49, 30 и 13%, соответственно [6].

Для определения доброкачественного либо злокачественного течения заболевания применяют дополни-

тельные методы исследования. Чаще всего используют иммуногистохимический метод (ИГХ), который широко применяется для верификации диагнозов.

Белок Ki-67 является маркером выбора и используется практически во всех случаях диагностики злокачественных опухолей. Его экспрессия отражает уровень пролиферации клеток эпителия, который считается одной из характеристик опухолевого процесса. Данный маркер выявляется во всех фазах митотического цикла, кроме G₀ [7]. Согласно исследованию Е. Mizukoshi и S. Kaneko, активность пролиферации поддерживается и контролируется теломерами и теломеразой [8]. Теломеры – концевые участки хромосом, образованные специфической теломерной ДНК. Они укорачиваются при делении клеток вследствие неполной репликации концевых участков. Данный процесс контролирует теломераза (telomerase reverse transcriptase – TERT). Она представляет собой РНК-зависимую ДНК-полимеразу, содержащую белковый компонент и ассоциированную РНК, которая используется в качестве матрицы для добавления теломерных повторов. Теломераза блокирует концевую недорепликацию ДНК и тем самым удлиняет теломеры, что помогает опухолевым клеткам делиться бесконечно и неконтролируемо [9]. Для характеристики злокачественных опухолей в последнее время большое значение приобретает молекулярно-генетический метод выявления теломеразной активности клеток, основанный на изучении повреждений генома опухолевой клетки [10]. Широкое применение получил метод флуоресцентной гибридизации (fluorescence in situ hybridization – FISH), он позволяет идентифицировать хромосомы, хромосомноспецифичные области или однокопийные уникальные последовательности при помощи меченых зондов. Зонд представляет собой специально синтезированные фрагменты ДНК, которые комплементарны необходимому участку ДНК, поэтому

можно провести исследование как целой хромосомы, так и ее отдельного участка. Метод FISH позволяет оценить генетический статус отдельной клетки среди других клеток, и его можно выполнять на неделящихся клетках. Считается, что при ПР наблюдаются множественные хромосомные повреждения, которые сопровождаются потерей или увеличением генетического материала в хромосомах, что свидетельствует о геномной нестабильности в опухолевых клетках [11]. Известно, что высокая активность хромосомного участка 3q26, который кодирует РНК-субъединицу теломеразы *TERC* (telomerase RNA component), часто наблюдается в таких злокачественных опухолях как рак гортани, желудка, кишечника и матки [12].

Цель данного исследования – изучить пролиферативную активность эпителиальных клеток, экспрессию TERT и амплификацию гена *TERC* теломеразы при гиперплазии эпителия, формировании эпителиальной дисплазии и ПР СОР.

Материалы и методы

Материалом исследования служили биоптаты СОР 60 пациентов (25 женщин и 35 мужчин) отделения заболеваний слизистой оболочки рта с клиническими диагнозами «лейкоплакия» и «плоскоклеточный рак» и архивный материал лаборатории патологической анатомии НМИЦ ЦНИИСиЧЛХ Минздрава России за период с 2019 по 2021 год. Средний возраст пациентов составил 66,7 года.

При гистологическом исследовании установлены четыре диагноза: «эпителиальная гиперплазия» (ЭГ), «эпителиальная дисплазия низкой степени» (ЭДНС), «эпителиальная дисплазия высокой степени» (ЭДВС), «плоскоклеточный рак» (ПР). В настоящем исследовании использовали бинарную систему классификации дисплазии эпителия, в которой объединили ЭДНС и эпителиальную дисплазию средней степени (ЭДСС) [13].

Для исследования были выделены четыре группы: в 1-ю группу включили 16 пациентов (26,6%) с диагнозом «эпителиальная гиперплазия», во 2-ю группу – 16 пациентов (26,6%) с диагнозом «эпителиальная дисплазия низкой степени», в 3-ю группу – 13 пациентов (21,6%) с диагнозом «эпителиальная дисплазия высокой степени», в 4-ю группу – 15 пациентов (25%) с диагнозом «плоскоклеточный рак».

Гистологическое и ИГХ исследования биопсийного материала проводили согласно стандартному протоколу. Для определения пролиферативной активности клеток использовали мышинные моноклональные антитела к Ki-67 (клон MM1, Diagnostic Biosystems, США). Активность TERT оценивали с помощью кроличьих поликлональных антител (TRT, Abbiotec, США). Флуоресцентную гибридизацию *in situ* проводили с применением ДНК-зондов (LSP TERC/CCP3 FISH Probe Kit, CytoTest, США). Зонд LSP TERC обнаруживает активацию гена *TERC* в хромосоме, а зонд CCP3 –

центромеру третьей хромосомы и указывает на число хромосом.

Индекс пролиферации по Ki-67 рассчитывали, как отношение количества клеток с иммунореактивными ядрами к общему числу ядер эпителиальных клеток. Большая часть пролиферирующих клеток при ЭГ локализуется в нижних слоях эпителия, поэтому экспрессию белка Ki-67 определяли в 300 клетках базального и парабазального слоев. При ЭДНС и ЭДВС оценка проводилась в ростковом и шиповатом слоях. Подсчет Ki-67 положительных ядер клеток при ПР проводили в центральной и периферической зонах опухоли.

Активность теломеразы TERT при ИГХ исследовании определяли в виде наличия реакции в ядрах клеток. Экспрессию белка оценивали по интенсивности окрашивания ядер в коричневый цвет: 0 – окрашивание отсутствует, 1 – слабая интенсивность окрашивания, 2 – умеренная интенсивность окрашивания, 3 – выраженное окрашивание. Реакцию FISH исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Imager M2 с фотофиксацией камерой AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss, Германия), где положительная реакция LSP TERC проявлялась оранжевым цветом, а CCP3 зеленым. Амплификацию гена *TERC* оценивали, как положительную при наличии более двух оранжевых сигналов, а появление зеленых сигналов (от трех и больше) указывало на увеличение числа хромосом.

TERT теломеразу при ИГХ и *TERC* при FISH исследовали в тех же участках, где определяли пролиферативную активность клеток, в площади стандартных размеров (на единицу площади), при $\times 200$ для ИГХ и $\times 1000$ для FISH.

Статистический анализ осуществляли при помощи программы SPSS Statistics 23 version в среде Windows 10 (IBM Corporation, США) с использованием непараметрических методов статистики. Для парного сравнения групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бонферрони, для множественного межгруппового сравнения – метод Тьюки. Показатели индекса Ki-67 представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1; Q3), различия между группами признавали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для метода FISH различия при сравнительном анализе методом Тьюки рассматривали как значимые при $p < 0,001$.

Результаты

При гистологическом исследовании ЭГ в препаратах выявлялся акантоз за счет увеличения количества клеток без признаков атипии на фоне пара- или гиперкератоза. Рост клеток наблюдался на фоне воспаления в собственной пластинке СОР. При изучении ЭДНС в эпителии отмечались нарушение рядности клеток и небольшое количество полиморфных клеток только в 1/2 эпителиального слоя, дифференцировка клеток сохранялась в верхних 2/3 эпителия. При ЭДВС в эпителии выявлялись выраженный клеточно-ядерный полиморфизм и высокая митотическая активность, которая

также отмечалась в клетках поверхностного эпителия. При гистологическом исследовании ПР определялись комплексы атипичных клеток плоского эпителия и инфильтрирующий рост в собственную пластинку СОР. Наблюдалось высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение в клетках, а также большое количество патологических митозов. При ороговевающем ПР СОР выявлялся дискератоз, который сопровождался появлением «раковых жемчужин». При неороговевающем ПР СОР отмечалась более выраженная тканевая и клеточная атипия по сравнению с ороговевающим ПР.

При ИГХ исследовании пролиферативной активности по Ki-67 при ЭГ иммунопозитивные клетки располагались только в ростковом слое и отсутствовали в шиповатом слое эпителия. В группе ЭДНС количество пролиферирующих клеток в ростковом слое было больше, чем при ЭГ, они отмечались в шиповатом слое. При ЭДВС пролиферирующие клетки выявлялись до поверхностного эпителиального слоя. В группе ПР активная пролиферация отмечалась во всех случаях,

и иммунореактивные клетки располагались в периферической и центральной зонах опухоли (рис. 1).

Между группами были выявлены статистически значимые различия индекса Ki-67 ($\chi^2=48,367$; $p<0,001$). Установлено, что ЭГ (Me=31,3 [28,0; 34,5]) отличается от ЭДНС (Me=40,3 [39,3; 43,2]) при уровне значимости $p=0,019$, от ЭДВС (Me=44,7 [39,8; 47,5]) и от ПР (Me=48,7 [54,0; 60,0]) при $p<0,001$. Значимые различия между ЭДНС и ЭДВС не выявлены ($p=1$). ПР по уровню пролиферативной активности значимо отличался от ЭДНС (Me=40,3; [39,3; 43,2]) при $p<0,001$, но не от ЭДВС (Me=44,7; [39,8; 47,5]) при $p=0,054$ (табл. 1).

Экспрессия теломеразы TERT обнаружена во всех случаях, окрашивание клеточных ядер соответствовало экспрессии Ki-67. В группе ЭГ выявлялось слабое окрашивание ядер клеток в базальном и парабазальном слоях, а в группе ЭДНС отмечалось дополнительное окрашивание клеток в нижней части шиповатого слоя, в группах ЭДВС и ПР наблюдалось интенсивное окрашивание клеточных ядер всех слоев и зон (рис. 2).

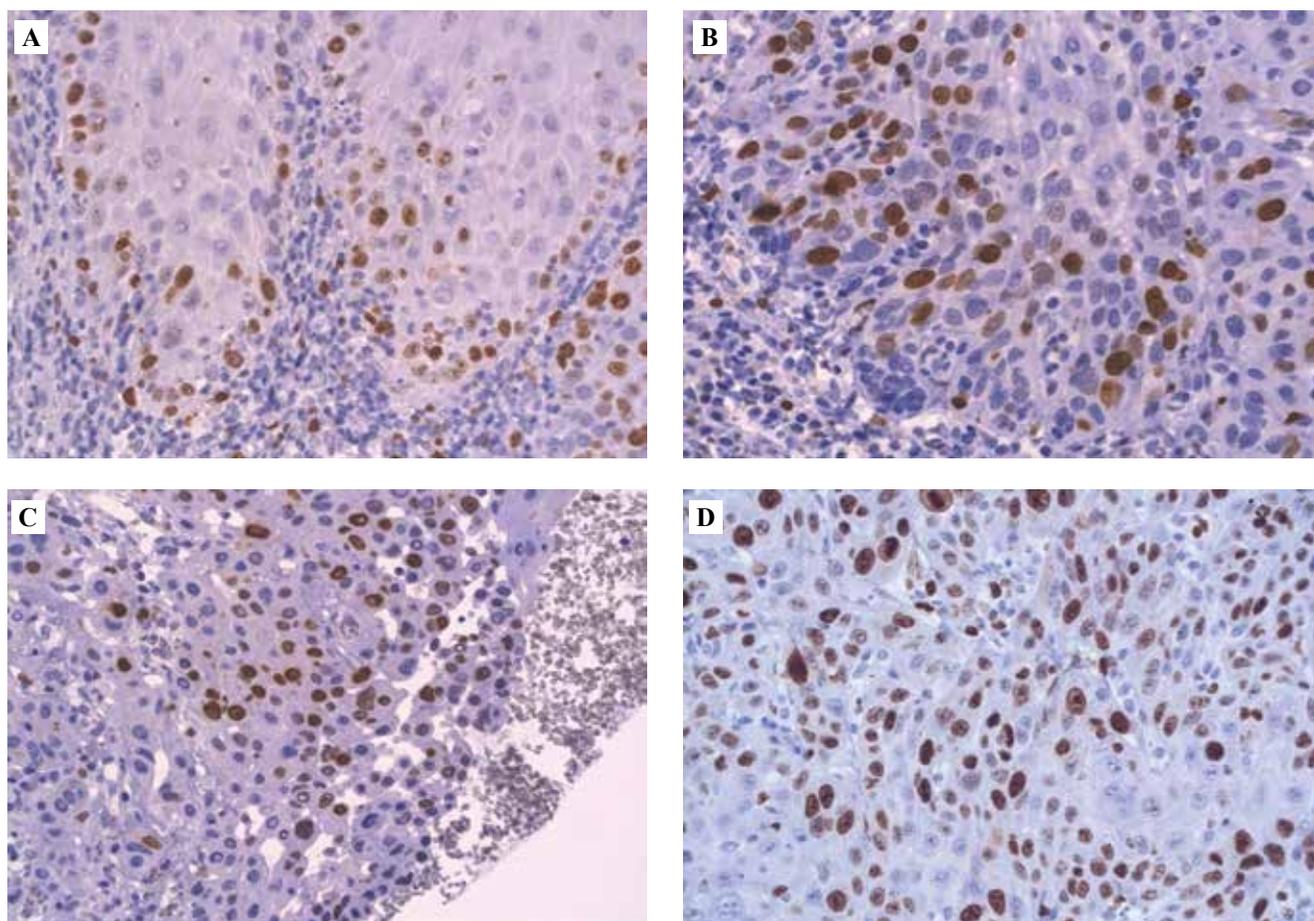


Рис. 1. Пролiferативная активность клеток в эпителии слизистой оболочки рта при гиперплазии (А), эпителиальной дисплазии низкой степени (В), эпителиальной дисплазии высокой степени (С) и плоскоклеточном раке (D). ИГХ реакция с антителами к Ki-67, окраска ДАБ – гематоксилин Майера, $\times 200$

Fig. 1. Proliferative cell activity in the epithelium of the oral mucosa in hyperplasia (A), low-grade epithelial dysplasia (B), high-grade epithelial dysplasia (C), and squamous cell carcinoma (D). IHC assay with Ki-67 antibodies, stain DAB – Mayer's hematoxylin, $\times 200$

При изучении *TERC* участка РНК в третьей хромосоме при ЭГ амплификация методом FISH выявлялась в 1,3% случаев, в 98,7% амплификация в ядрах клеток не выявлялась и характеризовалась как два оранжевых сигнала на фоне двух зеленых (2:2). При ЭДНС в 17,1% случаев соотношение сигналов составляло

2:2, при этом амплификация гена *TERC* отмечалась в 83,9% случаев и проявлялась в соотношении 2:3. При ЭДВС соотношение сигналов 2:2 наблюдалось в 2,7% случаев, а амплификация гена *TERC* в 97,3% в соотношении 2:3, 2:4, 2:5, 3:3. При ПР соотношение сигналов 2:2 присутствовало в 10,2% случаев, при этом

Таблица 1 | Table 1

Сравнительный анализ пролиферативной активности по Ki-67 в исследуемых группах методом Краскела–Уоллиса | Comparative analysis of Ki-67 proliferative activity in the groups by the Kruskal–Wallis test

Группы Groups	Проллиферативная активность по Ki-67 Ki-67 proliferative activity Me (Q1; Q3)	Парные сравнения Paired comparisons (p)					
		ЭГ–ЭДНС EH–LGED	ЭГ–ЭДВС EH–HGED	ЭГ–ПР EH–SCC	ЭДНС–ЭДВС LGED–HGED	ЭДНС–ПР LGED–SCC	ЭДВС–ПР HGED–SCC
ЭГ EH	31,3 (28,0; 34,5)	0,019	0,000	0,000	1,000	0,000	0,054
ЭДНС LGED	40,3 (39,3; 43,2)						
ЭДВС HGED	44,7 (39,8; 47,5)						
ПР SCC	54,0 (48,7; 60,0)						

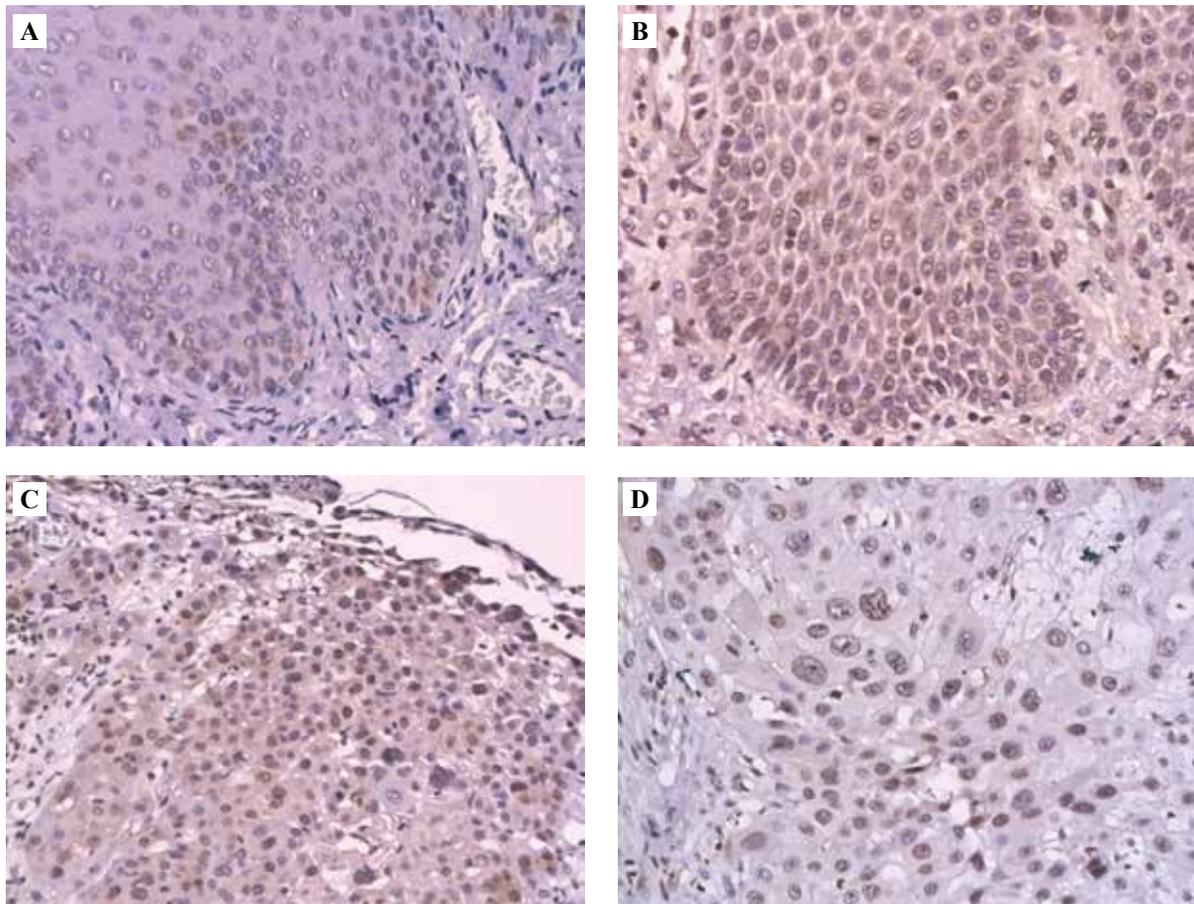


Рис. 2. Экспрессия теломеразы TERT в эпителии слизистой оболочки рта при гиперплазии (А), эпителиальной дисплазии низкой степени (В), эпителиальной дисплазии высокой степени (С) и плоскоклеточном раке (D). ИГХ реакция, экспрессия теломеразы TERT, окраска ДАБ – гематоксилин Майера, $\times 200$

Fig. 2. Expression of telomerase TERT in the epithelium of the oral mucosa in hyperplasia (A), low-grade epithelial dysplasia (B), high-grade epithelial dysplasia (C), and squamous cell carcinoma (D). IHC assay, TERT telomerase expression, stain DAB – Mayer's hematoxylin, $\times 200$

Множественные сравнения FISH сигналов между группами методом Тьюки |
Multiple comparisons of FISH signals between the groups by the Tukey's method

Группы Groups		Разность средней частоты случаев Difference of mean frequencies of cases	Стандартная ошибка Standard error	Значимость различий, p Significance of the differences, p
ЭГ EH	ЭДНС LGED	-11,43	3,73	<0,001
	ЭДВС HGED	-29,90	3,94	
	ПП SCC	-53,28	3,79	
ЭДНС LGED	ЭГ EH	11,43	3,73	
	ЭДВС HGED	-18,46	3,94	
	ПП SCC	-41,84	3,79	
ЭДВС HGED	ЭГ EH	29,90	3,94	
	ЭДНС LGED	18,46	3,94	
	ПП SCC	-23,37	4,00	
ПП SCC	ЭГ EH	53,28	3,79	
	ЭДНС LGED	41,84	3,79	
	ЭДВС HGED	23,37	4,00	

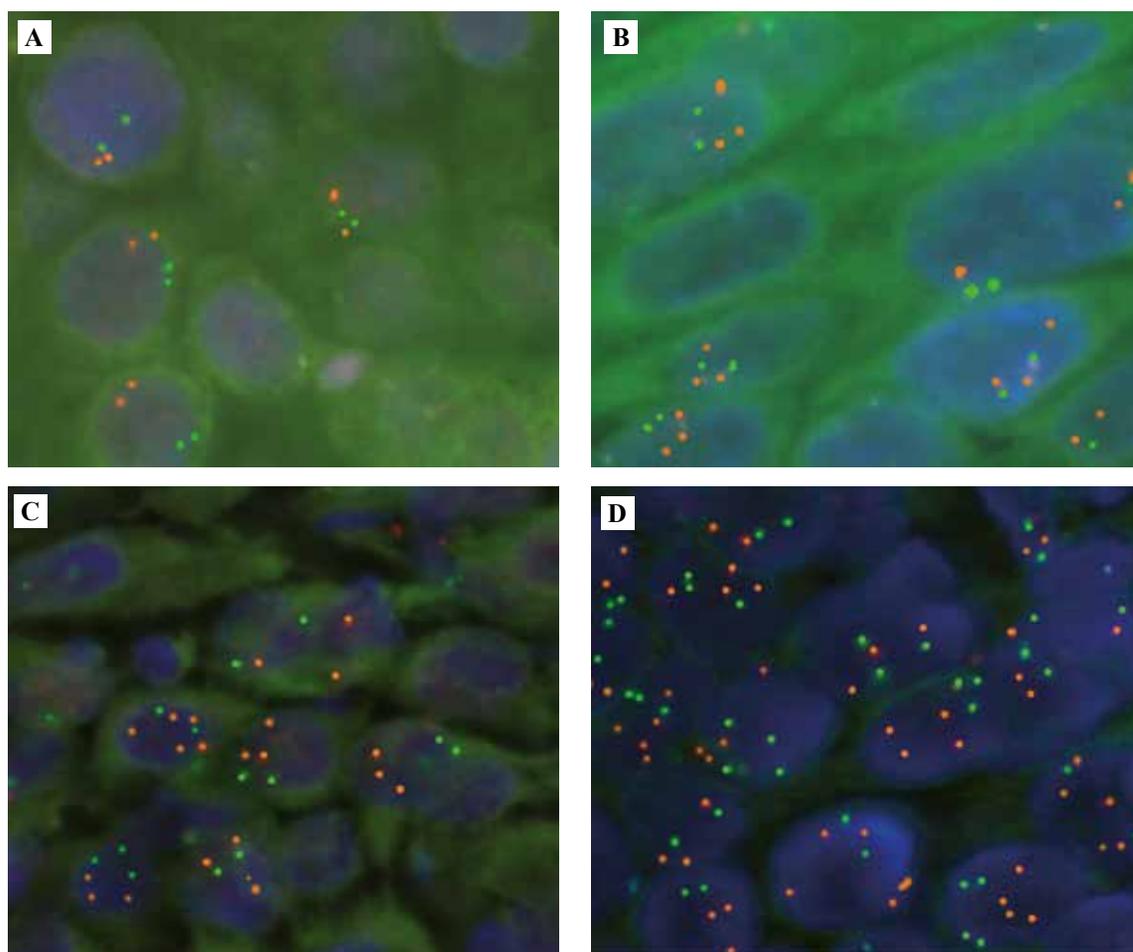


Рис. 3. Амплификация *TERC* методом FISH, $\times 1000$.

А – эпителиальная гиперплазия, В – эпителиальная дисплазия низкой степени, С – эпителиальная дисплазия высокой степени, D – плоскоклеточный рак

Fig. 3. Amplification of *TERC* by the FISH method, $\times 1000$.

A – epithelial hyperplasia, B – low-grade epithelial dysplasia, C – high-grade epithelial dysplasia, D – squamous cell carcinoma

Таблица 3 | Table 3

Показатели соотношения центромер третьей хромосомы и гена *TERC* в различных морфологических группах |
Ratios of centromeres of chromosome 3 to the *TERC* gene in different morphological groups

Группы (число случаев) Groups (Number of cases)	Число случаев положительных реакций по гену <i>TERC</i> (%) Number of cases of positive reactions for the <i>TERC</i> gene (%)	Количество клеток, (%) Number of cells, (%)	Характеристики типов сигналов по зондам CCP3 и <i>TERC</i> (%) Characteristics of signal types by CCP3 and <i>TERC</i> probes (%)						
			2:2	2:3	2:4	2:5	3:3	3:4	4:4
ЭГ (16) ЕН (16)	5 (31,5%)	20 (1,2%)	1,3	–	–	–	–	–	–
ЭДНС (16) LGED (16)	10 (62,5%)	203 (12,6%)	17,1	83,9	–	–	–	–	–
ЭДВС (13) HGED (13)	10 (76,9%)	405 (31,1%)	2,7	61,9	3,9	25,8	5,7	–	–
ПР (15) SCC (15)	15 (100%)	818 (54,5%)	10,2	11,3	3,1	18,5	25,4	24,6	6,9

соотношение сигналов составляло 2:3, 2:4, 2:5, 3:3, 3:4 и 4:4 в 89,8% случаев (рис. 3). Частота амплификации по зонду LSP *TERC* (оранжевый) увеличивается от ЭДНС к ПР (табл. 2). Для метода FISH сравнительный анализ методом Тьюки показал достоверность полученных результатов (табл. 2). Амплификация сигналов по зонду CCP3 (зеленый) присутствует в 5,7% случаев при ЭДВС и в 56,9% при ПР. Данный сигнал характеризует центромеры третьей хромосомы, что свидетельствует о триплоидии и тетраплоидии (табл. 3).

Обсуждение

Полученные результаты изучения пролиферативной активности подтверждают сведения A.R. Gadbaei et al. о том, что пролиферативная активность клеток эпителия напрямую зависит от степени клеточной и тканевой атипии многослойного плоского эпителия [14]. Маркер Ki-67 может предоставить уникальную информацию о клиническом состоянии и прогнозе заболевания.

По данным M. Jie et al., TERT обычно экспрессируется в клетках с высокой степенью самообновления и отсутствует в дифференцированных соматических клетках [15]. Авторы показали, что увеличение активной теломеразы значительно способствует инициации и развитию рака. Y. Liu et al. при изучении предраковых состояний и рака гортани описывали активную теломеразу как переходное событие в прогрессировании ПР [16]. Результаты этой работы свидетельствуют о том, что переход от ЭГ к ПР связан с прогрессирующим накоплением генетических изменений эпителиальных клеток, которые приводят к образованию клональной популяции малигнизированных клеток.

Согласно данным H. Liu et al., которые проводили исследование прогрессирования ЭД шейки матки до инвазивного рака, а также B. Singh et al., изучавших ПР СОР с использованием амплификации локуса *TERC*, была обнаружена геномная амплификация, которая значительно коррелировала с тяжестью дисплазии эпителия [17, 18]. Авторы исследований определили,

что активность *TERC* характерна для злокачественной трансформации эпителиальных клеток. В нашем исследовании при ЭГ амплификация *TERC* наблюдалась достаточно редко – в 1,3% случаев, что может свидетельствовать о доброкачественном процессе. При ЭДНС и ЭДВС, а также при ПР выявлялась амплификация гена *TERC*, что коррелировало со степенью дисплазии эпителия. Полученные результаты свидетельствуют о наличии изменений генома клеток, характерных для проявлений малигнизации эпителия, которые обнаруживаются при гистологическом и ИГХ исследованиях.

Заключение

В данной работе были изучены пролиферативная активность клеток эпителия, активность теломеразы TERT, а также амплификация гена *TERC* при возникновении в многослойном плоском эпителии гиперплазии, дисплазии и плоскоклеточного рака слизистой оболочки рта. По результатам исследования увеличение количества сигналов хромосомного участка *TERC* выявляется при озлокачествлении процесса, что может служить основным критерием для ранней диагностики злокачественных образований слизистой оболочки рта.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Ивина, И.И. Бабиченко. Сбор и обработка материала – Ю.О. Тигаи, О.Ф. Рабинович, В.А. Горячев, Д.Р. Фамилья Фриас. Написание текста – Ю.О. Тигаи. Редактирование – И.И. Бабиченко, А.А. Ивина.

Authors contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.A. Ivina, I.I. Babichenko. Collected the data and performed the analysis – Yu.O. Tigay, O.F. Rabinovich, V.A. Goryachev, D.R. Familia Frias. Wrote the paper – Yu.O. Tigay. Edited the manuscript – I.I. Babichenko, A.A. Ivina.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Кульбакин Д.Е., Чойзонов Е.Л., Толмачев И.В., Стариков Ю.В., Старикова Е.Г., Каверина И.С.* Искусственный интеллект в онкологии: области применения, перспективы и ограничения. *Вопросы онкологии.* 2022;68(6):691–699. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-691-699.
Kulbakin DE, Choizonov EL, Tolmachev IV, Starikov IuV, Starikova EG, Kaverina IS. Artificial intelligence in oncology: areas of its application, prospects and limitations. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology.* 2022;68(6):691–699 (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-691-699.
2. *Белякова Е.Н., Брико Н.И., Лопухов П.Д.* Характеристика заболеваемости раком головы и шеи, потенциально ассоциированным с вирусом папилломы человека, в России в 2007–2018 гг. *Профилактическая медицина.* 2021;24(2):30–36. DOI: 10.17116/profmed20212402130.
Belyakova EN, Briko NI, Lopukhov PD. Characteristics of the head and neck cancer incidence potentially associated with human papillomavirus in Russia in 2007–2018. *Profilakticheskaya Meditsina.* 2021;24(2):30–36 (In Russ.). DOI: 10.17116/profmed20212402130.
3. *Джурова Ш.Ф., Чистенко Г.Н., Терехова Т.Н., Иконникова А.В.* Рак полости рта: факторы риска и скрининг. Современная стоматология. 2020;2(79):3–7. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43991995> (получено 26.06.2023).
Dzhurava ShF, Chistenko GN, Terekhova TN, Ikonnikova AV. Oral cancer: risk factors and screening. *Sovremennaya stomatologiya.* 2020;2(79):3–7. Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43991995> (accessed 26.06.2023).
4. *Семченко И.М., Макарова О.В., Пронорович О.Н.* Предраковые поражения полости рта. Современная стоматология. 2021;4(85):31–41. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=47832565> (получено 26.06.2023).
Siomchenko IM, Makarova OV, Pronorovich ON. Precancerous lesions of the oral cavity. *Sovremennaya stomatologiya.* 2021;4(85):31–41. Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=47832565> (accessed 26.06.2023).
5. *Волкова Л.В., Шушвал М.С.* Морфологическая характеристика диспластических процессов в слизистой оболочке, прилегающей к опухоли, при раке желудка кишечного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(3):47–54. DOI 10.31088/CEM2021.10.3.47-54.
Volkova LV, Shushval MS. Morphological characteristics of dysplasia in the mucous membrane adjacent to the tumor in intestinal type gastric cancer. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(3):47–54 (In Russ.). DOI 10.31088/CEM2021.10.3.47-54.
6. The WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds.). WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC, 2017. 347 p.
7. *Gadbail AR, Chaudhary M, Sarode SC, Gondivkar S, Tekade SA, Zade P et al.* Ki67, CD105, and α -SMA expression supports the transformation relevant dysplastic features in the atrophic epithelium of oral submucous fibrosis. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200171. DOI: 10.1371/journal.pone.0200171.
8. *Mizukoshi E, Kaneko S.* Telomerase-targeted cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1823. DOI: 10.3390/ijms20081823.
9. *Егоров Е.Е.* Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2010;3(2):184–197. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15280404> (получено 26.06.23).
Egorov EE. Telomeres, telomerase, oncogenesis and measure of health. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice.* 2010;3(2):184–197 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15280404> (accessed 26.06.2023).
10. *Боженко В.К., Захаренко М.В., Кулинич Т.М., Джикия Е.Л., Сенчукова А.Л., Станоевич У.С. и др.* Исследование уровня экспрессии гена *TERT* в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. 2020;20(3):15–39. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/wforgp> (получено 26.06.2023).
Bozhenko VK, Zakharenko MV, Kulnich TM, Dzhikiya EL, Senchukova AL, Stanoevich US et al. Investigation of the level of TERT gene expression in the colon mucosa in various pathologies. *Vestnik of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.* 2020;20(3):15–39 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/wforgp> (accessed 26.06.2023).
11. *Курчин В.П., Смолякова Р.М., Бамбиза А.В., Матусевич В.А.* Молекулярно-генетическое профилирование плоскоклеточного рака легкого. Экологический вестник. 2016;1(35):99–104. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44548873> (получено 26.06.2023).
Kurchyn VP, Smolyakova RM, Bambiza AV, Matusевич VA. Molecular genetic profiling squamous lung cancer. *Ekologicheskii Vestnik.* 2016;1(35):99–104 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44548873> (accessed 26.06.2023).
12. *Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А.* Регуляция теломеразы в онкогенезе. *Acta Naturae.* 2009;1(1):51–67. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15113854> (получено 26.06.2023).
Skvortsov DA, Rubtsova MP, Zvereva MI, Kiselev FL, Dontsova OA. Regulaciya telomerazy v onkogeneze (Regulation of telomerase in oncogenesis). *Acta Naturae.* 2009;1(1):51–67 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15113854> (accessed 26.06.2023).
13. *Nankivell P, Williams H, Matthews P, Suortamo S, Snead D, McConkey C et al.* The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(1):87–94. DOI: 10.1016/j.oooo.2012.10.015.
14. *Gadbail AR, Sarode SC, Chaudhary MS, Gondivkar SM, Tekade SA, Yuwanati M et al.* Ki67 Labelling Index predicts clinical outcome and survival in oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 2021;29: e20200751. DOI: 10.1590/1678-7757-2020-0751.
15. *Jie MM, Chang X, Zeng S, Liu C, Liao GB, Wu YR et al.* Diverse regulatory manners of human telomerase reverse transcriptase. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):63. DOI: 10.1186/s12964-019-0372-0.
16. *Liu Y, Dong XL, Tian C, Liu HG.* Human telomerase RNA component (hTERC) gene amplification detected by FISH in precancerous lesions and carcinoma of the larynx. *Diagn Pathol.* 2012;7:34. DOI: 10.1186/1746-1596-7-34.

17. Liu H, Liu S, Wang H, Xie X, Chen X, Zhang X *et al.* Genomic amplification of the human telomerase gene (hTERT) associated with human papillomavirus is related to the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *Diagn Pathol.* 2012;7:147. DOI: 10.1186/1746-1596-7-147.
18. Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR *et al.* Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 2002;161(2):365–71. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64191-0.

Информация об авторах

Анастасия Анатольевна Ивина – доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии РУДН им. Патриса Лумумбы.

Юлия Олеговна Тигай – ассистент кафедры патологической анатомии РУДН им. Патриса Лумумбы.

Ольга Филипповна Рабинович – доктор медицинских наук, заведующая отделением патологии слизистой оболочки полости рта ЦНИИСиЧЛХ.

Вячеслав Александрович Горячев – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова РУДН им. Патриса Лумумбы.

Диана Росина Фамилья Фриас – ассистент кафедры патологической анатомии РУДН им. Патриса Лумумбы.

Игорь Иванович Бабиченко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии РУДН им. Патриса Лумумбы, заведующий лабораторией патологической анатомии ЦНИИСиЧЛХ.

Author information

Anastasia A. Ivina – Dr. Sci. (Med), Associate Professor, Department of Anatomic Pathology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia;

<https://orcid.org/0000-0001-8387-4413>

Yulia O. Tigay – Assistant, Department of Anatomic Pathology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-6500-9220>

Olga F. Rabinovich – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathology of the Oral Mucosa, Central Research Institute of Stomatology and Maxillofacial Surgery.

<https://orcid.org/0000-0002-1018-9017>

Vyacheslav A. Goryachev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, V.A. Frolov Department of General Pathology and Pathological Physiology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-2787-5494>

Diana R. Familia Frias – Assistant, Department of Anatomic Pathology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0001-7878-2901>

Igor I. Babichenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Anatomic Pathology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; Head of the Laboratory of Anatomic Pathology, Central Research Institute of Stomatology and Maxillofacial Surgery.

<https://orcid.org/0000-0001-5512-6813>

Морфологический анализ семенников в оценке фертильности мышей после однократного острого γ -облучения разными дозами

В.П. Мамина

ФГБУН Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Резюме. *Введение.* Лучевая терапия злокачественных новообразований создает повышенный риск для возникновения нарушений в мужской репродуктивной системе. Роль морфологических изменений семенников в оценке фертильности при облучении в летальных и сублетальных дозах изучена слабо. Цель работы – проведение сравнительного морфологического исследования семенников, сперматозоидов и фертильного потенциала у самцов мышей после однократного острого γ -облучения разными дозами.

Материалы и методы. В эксперименте на самцах линии BALB/c, подвергнутых острому однократному γ -облучению в дозах 1 и 6 Гр на установке ИГУР (Cs^{137} , мощность дозы 0,85 Гр/мин), изучали структурное состояние семенников и сперматозоидов. Морфологическое исследование проводили методом оптической микроскопии гистологических препаратов с использованием микроскопа с цифровым микрофотографированием ($n=180$). Фертильный потенциал оценивали путем спаривания облученных самцов ($n=200$) с интактными половозрелыми самками ($n=400$).

Результаты. В течение эксперимента (16–120-е сутки) в опытных группах выявлены глубокие морфологические изменения в семенниках, сперматозоидах. Максимальное увеличение числа семенных канальцев с деструкцией при дозах 1 и 6 Гр наблюдается на 62-е сутки: со сдуванием половых клеток в 2 и 4 раза, десквамацией сперматогенного эпителия в 3 и 6 раз, запустеванием семенных канальцев в 2 и 10 раз, соответственно. Максимальное снижение численности сперматозоидов составило 68 и 44% при дозах облучения 1 и 6 Гр, соответственно. Количество живых спермиев понизилось до 62% и 25%, их подвижность уменьшилась на 21% и 100%. Выявлено увеличение числа патологических форм сперматозоидов на 40% и в 3 раза при дозах 1 и 6 Гр, соответственно. Отмечено возрастание общей эмбриональной и индуцированной постимплантационной смертности у самок, оплодотворенных самцами, облученными на всех стадиях сперматогенеза ($p<0,05$), при дозе 6 Гр у самцов, находящихся на стадиях сперматид и сперматоцитов, выявлена временная стерильность.

Заключение. Степень и глубина морфологических изменений в семенниках, сперматозоидах являются дозозависимыми. Наиболее выраженные изменения при дозе 6 Гр вызывают временную стерильность. Выявлена компенсаторно-восстановительная реакция со стороны сперматогенеза.

Ключевые слова: γ -облучение, сперматогенез, сперматозоид, фертильность

Для корреспонденции: Вера Павловна Мамина. E-mail: mamina@ipae.uran.ru

Для цитирования: Мамина В.П. Морфологический анализ семенников в оценке фертильности мышей после однократного острого γ -облучения разными дозами. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):32–41. DOI: 10.31088/SEM2023.12.4.32-41.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Института экологии растений и животных Уральского отделения РАН (№ 122021000085-1).

Статья поступила 21.10.2022. Получена после рецензирования 29.11.2022. Принята в печать 10.04.2023.

Assessing mouse fertility by morphological analysis of testicles following acute γ -irradiation at various doses

V.P. Mamina

Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

Abstract. *Introduction.* Radiation therapy for malignant neoplasms can have detrimental effects on male reproductive health. Little is known about the role of morphological changes in the testes when assessing the fertility after exposure to lethal and sublethal doses. The research aimed to investigate the impact of acute γ -irradiation at various doses on testicular morphology, spermatozoa, and fertility potential in mice through a comparative morphological analysis.

Materials and methods. We subjected BALB/c mice to acute γ -irradiation at doses of 1 and 6 Gy using the IGUR device (Cs^{137} , dose rate of 0.85 Gy/min). We studied the structural state of the testes and spermatozoa. Morphological examination was performed using optical microscopy of histological slides with digital microphotography ($n=180$). Fertility potential was assessed by mating irradiated males ($n=200$) with intact mature females ($n=400$).

Results. During the course of the experiment, which lasted from 16 to 120 days, we observed significant morphological changes in the testes and spermatozoa of the experimental groups. On day 62, the number of seminiferous tubules exhibiting destruction at 1- and 6-Gy doses was the highest. This destruction was characterized by a 2- to 4-fold increase in the desquamation of germ cells, a 3- to 6-fold increase in the desquamation of the spermatogenic epithelium, and a 2- to 10-fold increase in the desolation of the seminiferous tubules, respectively. The maximum decrease in the number of spermatozoa was to 68 and 44% at doses of 1 and 6 Gy, respectively. The number of live spermatozoa decreased to 62% and 25%; sperm motility dropped by 21% and 100%. We detected an increase in the number of pathological forms of spermatozoa by 40% and 3 times at doses of 1 and 6 Gy, respectively. An increase in the total embryonic and induced post-implantation mortality in females fertilized by irradiated males was noted at all stages of spermatogenesis ($p<0.05$). At a 6-Gy dose, we detected a temporary sterility at the stages of spermatids and spermatocytes.

Conclusion. The degree and depth of morphological changes in the testes and spermatozoa are dose-dependent, the most pronounced changes being at a 6-Gy dose causing temporary sterility. A compensatory-restorative reaction from spermatogenesis was revealed.

Keywords: γ -irradiation, spermatogenesis, spermatozoon, fertility

Corresponding author: Vera P. Mamina. E-mail: mamina@ipae.uran.ru

For citation: Mamina V.P. Assessing mouse fertility by morphological analysis of testicles following acute γ -irradiation at various doses. Clin. exp. morphology. 2023;12(4):32–41 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.32-41.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Institute of Plant and Animal Ecology (No. 122021000085-1).

Received 21.10.2022. **Received in revised form** 29.11.2022. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Одной из актуальных проблем в области репродуктивного здоровья человека является рост числа бесплодных браков, которые более чем в 45% случаев обусловлены мужским бесплодием [1–3]. Ионизирующее излучение входит в число основных факторов, негативно влияющих на репродуктивный потенциал. Широкое использование источников ионизирующего излучения в различных сферах деятельности человека, в том числе лучевой терапии злокачественных новообразований, создает повышенный риск для возникновения нарушений в мужской репродуктивной системе, которые в большинстве случаев являются причиной бездетности [4]. Семенники, обладающие высокой чувствительностью к воздействию ионизирующего излучения, относятся к 1-й группе критических органов [5, 6]. В радиобиологических исследованиях для оценки воздействия ионизирующего излучения на репродуктивный потенциал в качестве тест-системы принято использовать процесс сперматогенеза. Одним из основных показателей радиационного поражения репродуктивной системы является морфологический анализ семенников, позволяющий прогнозировать отдаленные эффекты и оценивать риск мужского бесплодия [7, 8]. Морфологическая характеристика семенников позволяет установить степень нарушения герминативного и эндокринного отделов, определить репаративные возможности эпителиосперматогенного слоя. Исследование морфологических признаков, характерных для

повреждений индуцированных облучением семенников, дает возможность для разработки лечебно-профилактических мер в области репродуктивного здоровья мужчин. В достаточно обширной литературе по влиянию ионизирующего излучения на репродуктивную систему самцов практически отсутствуют данные, касающиеся сравнительного анализа морфологических показателей семенника и фертильности животных. Цели работы – проведение морфологического исследования семенников, сперматозоидов и оценка их роли в фертильном потенциале у мышей после однократного острого γ -облучения разными дозами.

Материалы и методы

В исследовании были использованы самцы мышей линии BALB/c в возрасте 2,5–3 месяцев массой тела 23–25 граммов ($n=380$) и интактные самки ($n=400$). Животных содержали в стандартных условиях вивария: температура воздуха +18–22°C, влажность 70–75%, освещение с 12-часовым циклом свет–темнота, стандартный рацион питания. Эксперименты проводили согласно требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), с разрешения биоэтической комиссии Института экологии растений и животных Уральского отделения РАН (протокол № 13 от 12.12.2022). Животные были разделены на три группы: 1-я группа – интактный контроль, животных 2-й группы подвергали однократному

облучению в дозе 1 Гр, животных 3-й группы – в дозе 6 Гр. Облучение проводили на установке ИГУР (Россия) (Cs^{137} , мощность дозы 0,85 Гр/мин) [9].

Животных всех групп выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации на 8-е, 16-е, 24-е, 32-е, 48-е, 62-е, 90-е и 120-е сутки. Семенники фиксировали в смеси Буэна с последующей общепринятой гистологической обработкой. При морфологическом анализе семенников учитывали долю извитых семенных канальцев с деструктивными изменениями, слущиванием половых клеток в просвет семенных канальцев, десквамацией сперматогенного эпителия и запустеванием семенных канальцев. Для оценки состояния сперматогенного эпителия использовали индекс сперматогенеза, который рассчитывали по формуле

$$I = \frac{\sum a}{N},$$

где a – произведение количества извитых семенных канальцев с различными генерациями половых клеток, N – число проанализированных канальцев [10]. Количество эпидидимальных сперматозоидов, их подвижность определяли в камере Горяева, жизнеспособность – в мазках с помощью окрашивания эозином и нигрозином. При цитологическом анализе сперматозоидов выделяли патологические формы: с атипичным строением головки, цитоплазматические капли в области шейки или головки, с атипичным строением жгутика (короткий жгутик, изло-

манная форма жгутика, закрученные в виде петли). Для морфологического анализа использованы 180 самцов.

Для оценки фертильности самцов, находящихся во время радиационного воздействия на разных стадиях сперматогенеза (зрелые сперматозоиды, сперматиды, сперматоциты, сперматогонии и стволовые клетки, соответственно), их подсаживали к интактным половозрелым самкам через 1–7, 11–21, 22–24, 28–35 и после 35 суток. У самок определяли количество желтых тел яичника, живых плодов на самку, гибель эмбрионов до имплантации и после нее, общую эмбриональную и индуцированную постимплантационную смертность с учетом цикла сперматогенного эпителия самцов [11]. Для спаривания использованы 200 самцов и 400 самок.

После проверки на нормальность распределения цифровые данные подвергали статистической обработке с применением методов вариационной статистики (t -критерия Стьюдента) при 95% уровне значимости различий между показателями животных опытных и контрольной групп. Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

Цитологический анализ семенников у мышей контрольной группы показал активный сперматогенез без каких-либо изменений (рис. 1 А). В семенниках мы-

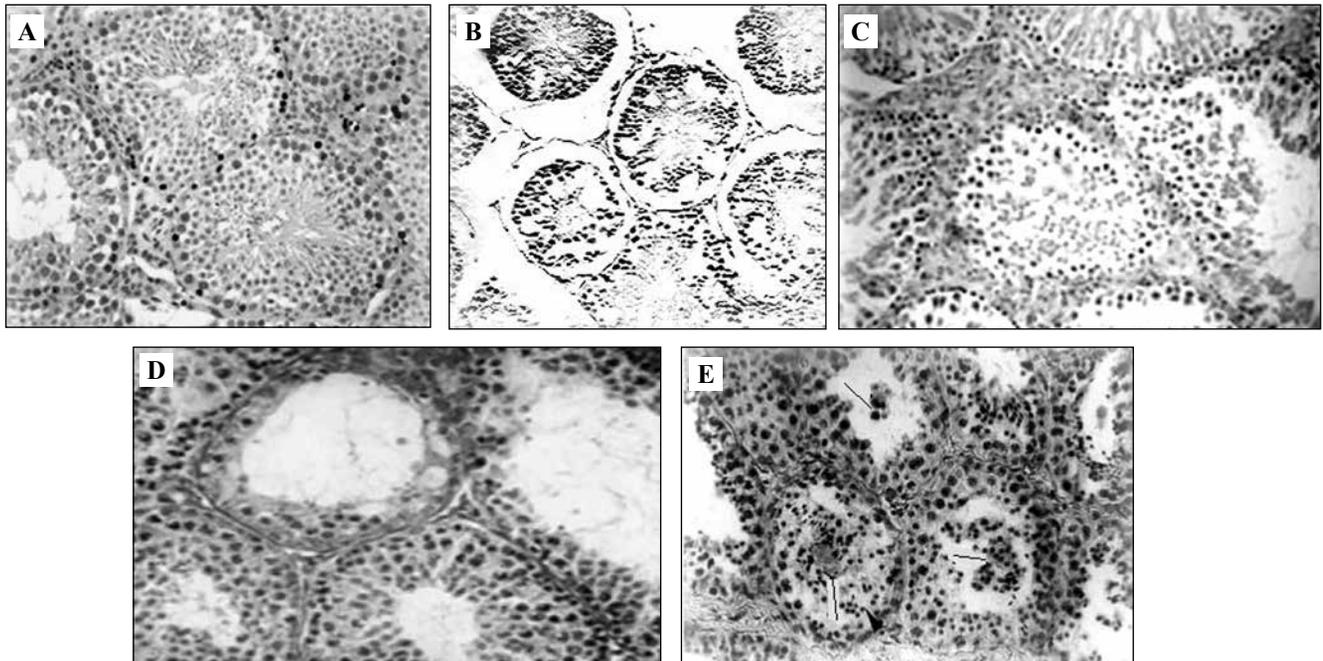


Рис. 1. Морфологические изменения в семенных канальцах после облучения.

А – семенные канальцы с активным сперматогенезом, структура без изменений, В – десквамация эпителиосперматогенного слоя, С – дезорганизация эпителиосперматогенного слоя, Д – запустевание семенных канальцев, Е – слущивание половых клеток в просвет канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 200$, В, С – $\times 150$, Д – $\times 200$, Е – $\times 400$

Fig. 1. Morphological changes in seminiferous tubules after irradiation.

A – seminiferous tubules with active spermatogenesis, structure without changes, B – desquamation of the epithelial spermatogenic layer, C – disorganization of the epithelial spermatogenic layer, D – emptying of the seminiferous tubules, E – desquamation of germ cells into the lumen of the tubules. H&E stain. A – $\times 200$, B, C – $\times 150$, D – $\times 200$, E – $\times 400$

шей из опытных групп в течение всего эксперимента выявлены статистически значимое увеличение числа семенных канальцев с десквамацией эпителиосперматогенного слоя, дезорганизацией сперматогенного эпителия, запустеванием семенных канальцев, слущиванием половых клеток в просвет канальцев (рис. 1 В–D) и снижение индекса сперматогенеза.

В отдельных семенных канальцах выявлены многоядерные сперматиды, сперматогонии с апоптозоподобными ядрами, аномальные митозы, вакуоли,

которые образуются на месте гибели сперматоцитов (рис. 2 А–D).

Морфологический анализ эпидидимальных сперматозоидов у мышей опытных групп показал увеличение количества патологических форм спермиев, снижение числа и подвижности живых спермиев. К основным морфологическим изменениям сперматозоидов относятся аномальные головки и жгутики в виде петли (рис. 3 А–D).

У мышей после облучения в дозе 1 Гр статистически значимое увеличение числа семенных каналь-

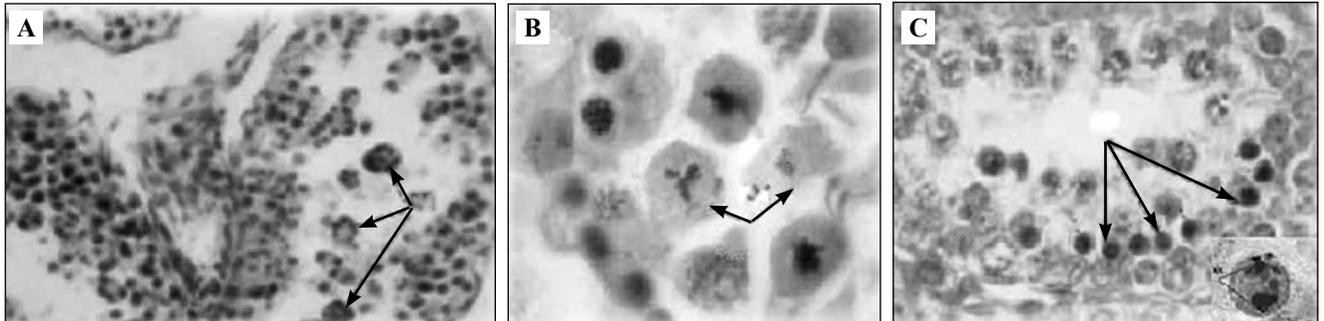


Рис. 2. Морфологические изменения в сперматогенных клетках после облучения.

А – семенные канальцы с многоядерными сперматидами (стрелка),
В – сперматогенные клетки с аномальными митозами и микроядрами (стрелка),
С – сперматогонии с апоптозоподобными ядрами (стрелка),
D – вакуоли, образующиеся на месте гибели половых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 400$, В – $\times 1500$, С, D – $\times 600$

Fig. 2. Morphological changes in spermatogenic cells after irradiation.

А – seminiferous tubules with multinucleated spermatids (arrow),
В – spermatogenic cells with abnormal mitoses and micronuclei (arrow),
С – spermatogonia with apoptosis-like nuclei (arrow),
D – vacuoles formed at the site of dead germ cells. H&E stain. А – $\times 400$, В – $\times 1500$, С, D – $\times 600$

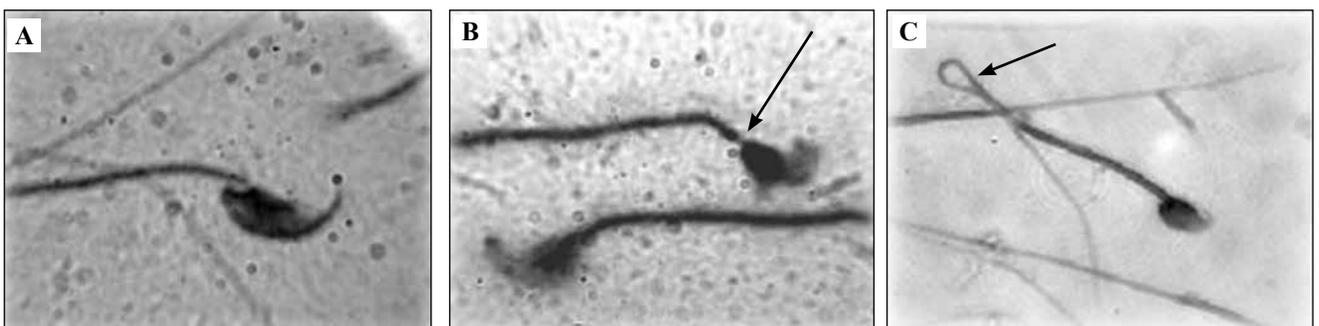


Рис. 3. Морфология сперматозоидов после облучения.

А – сперматозоид с нормальной морфологической структурой,
В – сперматозоид с аномальной головкой (стрелка), С, D – сперматозоид с аномалией хвоста в его разных отделах (стрелка). Окраска эозином и нигрозином. А, В – $\times 1500$, С, D – $\times 1000$

Fig. 3. Morphology of sperm cells after irradiation.

А – sperm with a normal morphological structure, В – sperm with an abnormal head (arrow), С, D – sperm with an abnormal tail in its different parts (arrow). Eosin-nigrosin staining. А, В – $\times 1500$, С, D – $\times 1000$

цев с различными морфологическими изменениями сохраняется до 90 суток, при дозе 6 Гр – до 120 суток (табл. 1). Наиболее выраженные морфологические изменения в семеннике при дозе 6 Гр приводят к резкому снижению индекса сперматогенеза ($0,5 \pm 0,04$ против $3,5 \pm 0,4$ в контроле), тогда как при дозе 1 Гр нижняя граница показателя составляет $2,4 \pm 0,1$ (табл. 1).

Количество сперматозоидов на 32-е, 48-е и 62-е сутки при дозе 1 Гр снизилось до 82, 76 и 70%, соответственно, число живых спермиев – до 60, 50%, подвижность спермиев уменьшилась на 21%, число патологических форм сперматозоидов во все исследуемые сроки увеличилось на 30% (табл. 2, $p < 0,05$). При дозе 6 Гр в эти же сроки количество сперматозоидов снизилось до 63 и 44%, число живых спермиев – до 40

и 20%, сперматозоиды утратили подвижность, число патологических форм увеличилось в 1,5–3 раза (табл. 2, $p < 0,05$).

Статистически значимое увеличение общей эмбриональной и индуцированной постимплантационной смертности у самок выявлено в опытных группах при облучении самцов на всех стадиях сперматогенеза, при дозе 1 Гр максимальный подъем отмечен на стадии сперматоцитов, при дозе 6 Гр самцы, у которых в момент облучения половые клетки находились на стадиях сперматоцитов и сперматид, оказались стерильными (табл. 3, $p < 0,05$). Вклад в общую эмбриональную смертность вносит как доимплантационная, так и постимплантационная гибель плодов, почти в равной доле.

Таблица 1 | Table 1

Количество извитых семенных канальцев с деструктивными изменениями у мышей после острого однократного облучения в дозах 1 и 6 Гр | The number of convoluted seminiferous tubules with destructive changes in mice after acute single irradiation at doses of 1 and 6 Gy

Время после облучения, суток Time after irradiation, day	Число канальцев со слущиванием половых клеток, % Number of tubules with germ cell desquamation, %	Число канальцев с десквамацией сперматогенного эпителия, % Number of tubules with spermatogenic epithelium desquamation, %	Запустевание извитых семенных канальцев, % Desolation of convoluted seminiferous tubules, %	Индекс сперматогенеза, усл. ед. Spermatogenesis index, cond. units
Контроль Control	$2,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,05$	$3,5 \pm 0,4$
Облучение 1 Гр 1-Gy irradiation				
16	$4,0 \pm 0,3^*$	$3,0 \pm 0,4^*$	$1,5 \pm 0,1^*$	$2,5 \pm 0,2^*$
32	$5,3 \pm 0,4^*$	$4,5 \pm 0,5^*$	$1,8 \pm 0,2^*$	$2,4 \pm 0,1^*$
62	$5,0 \pm 0,5^*$	$4,8 \pm 0,5^*$	$1,6 \pm 0,1^*$	$2,5 \pm 0,2^*$
90	$3,8 \pm 0,3^*$	$2,5 \pm 0,2^*$	$1,5 \pm 0,08^*$	$2,8 \pm 0,3^*$
120	$2,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,07$	$3,2 \pm 0,4$
Облучение 6 Гр 6-Gy irradiation				
16	$8,1 \pm 0,7^*$	$5,4 \pm 0,4^*$	$4,0 \pm 0,3^*$	$1,7 \pm 0,2^*$
32	$10,1 \pm 0,9^*$	$8,5 \pm 0,7^*$	$6,5 \pm 0,5^*$	$0,8 \pm 0,07^*$
62	$12,0 \pm 1,2^*$	$10,1 \pm 0,9^*$	$8,8 \pm 0,7^*$	$0,5 \pm 0,04^*$
90	$6,2 \pm 0,6^*$	$7,8 \pm 0,7^*$	$8,3 \pm 0,8^*$	$0,6 \pm 0,05^*$
120	$4,2 \pm 0,3^*$	$4,5 \pm 0,4^*$	$2,1 \pm 0,2^*$	$2,6 \pm 0,3^*$

* статистически значимые отличия опытной группы от группы контроля ($p < 0,05$) | statistically significant differences between the experimental group and the control group ($p < 0,05$)

Таблица 2 | Table 2

Показатели морфофункционального состояния сперматозоидов у мышей после острого однократного облучения в дозах 1 и 6 Гр | Morphofunctional state of spermatozoa in mice after acute irradiation at doses of 1 and 6 Gy

Время после облучения, суток Time after irradiation, day	Число спермиев, млн/мл Number of sperms, million/ml	Количество живых спермиев, % Number of live sperms, %	Патологические формы спермиев, % Pathological sperm forms, %	Подвижность, мкм/сек Mobility, $\mu\text{m}/\text{sec}$
Контроль Control	1,58±0,2	80,0±7,0	29,5±2,1	51,1±5,6
Облучение 1 Гр 1-Gy irradiation				
8	1,55±0,15	78,0±8,0	38,5±3,0*	52,0±5,0
16	1,50±0,20	75,0±6,9	37,1±3,2*	49,1±6,0
24	1,48±0,10	75,0±7,0	36,2±2,9*	48,6±4,9
32	1,41±0,15*	60,0±5,9*	35,3±3,5*	40,5±4,0*
48	1,40±0,18*	50,0±4,5*	40,1±4,0*	40,0±3,9*
62	1,10±0,07*	50,0±5,0*	42,0±3,9*	45,1±4,4*
90	1,45±0,09	77,0±8,5	40,7±2,9*	50,0±4,9
120	1,60 ±0,16	75,0±7,3	30,3±3,0	49,8±5,0
Облучение 6 Гр 6-Gy irradiation				
8	1,51±0,1	80,0±8,0	40,0 ±2,5*	58,8±6,0
16	1,50±0,09	75,0±7,0	42,8 ±2,8*	57,4±5,8
24	1,48±0,08	75,0±8,0	44,2 ±4,1*	41,3±4,6*
32	0,99±0,09*	38,0±4,0*	45,1 ±4,5*	0
48	1,06±0,1*	40,0±4,0*	90,0 ±9,1*	0
62	0,69±0,06*	20,0±2,0*	90,0±9,1*	0
90	0,79±0,07*	50,0±5,0*	38,1±2,0*	40,8±5,0*
120	1,33±0,1*	60,0±6,0*	40,1±3,0*	38,8±4,2*

* статистически значимые отличия опытной группы от группы контроля ($p < 0,05$) | statistically significant differences between the experimental group and the control group ($p < 0.05$)

Таблица 3 | Table 3

Эмбриональная смертность у самок, оплодотворенных самцами, половые клетки которых в момент облучения находились на разных стадиях сперматогенеза | Embryonic mortality in females fertilized by males whose germ cells were at different stages of spermatogenesis at the time of irradiation

Стадия сперматогенеза Stage of spermatogenesis	Показатели (среднее число на самку) Indicators (average per female)			ОЭС, % TES, %	ДС, % DS, %	ПС, % PS, %	Индукцированная ПС, % Induced PS, %
	желтые тела беременности yellow bodies of pregnancy	места имплантации implantation sites	живые эмбрионы live embryos				
Контроль Control	11,1±0,85	8,3±0,64	6,7±0,51	39,1±3,10	24,5±1,95	14,5±1,0	0
Облучение в дозе 1 Гр 1-Gy irradiation							
Сперматозоиды Spermatozoa	10,0±0,70	7,0±0,60*	5,7±0,35*	43,0±4,5*	30,0±2,5*	18,6±1,3*	4,5±0,4
Сперматиды Spermatis	9,4±0,91	6,3±0,55*	5,0±0,45*	46,8±4,3*	33,0±4,2*	20,6±1,9*	7,1±0,7
Сперматоциты Spermatoocytes	9,5±0,83	5,2±0,40*	4,3±0,38*	54,7±5,8*	45,2±4,5*	34,6±1,3*	23,5±1,9
Сперматогонии Spermatoγονia	11,1±0,80	7,4±0,64*	5,6±0,42*	48,6±4,0*	33,0±2,50*	23,0±2,1*	10,0±0,9
Стволовые клетки Stem cells	10,5±0,85	7,8±0,7	6,0±0,6	42,8±4,2	25,7±2,4	17,1±1,6	3,0±0,25
Облучение в дозе 6 Гр 6-Gy irradiation							
Сперматозоиды Spermatozoa	9,6±0,75	5,0±0,38	4,0±0,35*	58,3±4,8*	47,9±3,9*	20,0±2,0*	6,4±0,5
Сперматиды Spermatis	0	0	0	0	0	0	0
Сперматоциты Spermatoocytes	0	0	0	0	0	0	0
Сперматогонии Spermatoγονia	10,0±0,9	4,7±0,39*	3,5 ± 0,28*	65,0±6,1*	53,0±5,0*	29,7±2,8*	18,0±1,52
Стволовые клетки Stem cells	8,6±0,75	6,3±0,54	4,0 ± 0,30*	53,4±4,8*	38,4±3,2*	26,7±2,5*	14,0±1,25

* статистически значимые отличия опытной группы от группы контроля (p<0,05), ОЭС – общая эмбриональная смертность, ДС – доимплантационная смертность, ПС – постимплантационная смертность | statistically significant differences between the experimental group and the control group (p<0,05), TES – total embryonic mortality, DS – pre-implantation mortality, PS – post-implantation mortality

Обсуждение

В данной экспериментальной работе впервые проведено комплексное исследование влияния острого однократного облучения в сублетальной и летальной дозах на морфофункциональное состояние семенников, сперматозоидов и фертильность самцов, находящихся на разных стадиях сперматогенеза. Выявление степени риска для репродуктивного здоровья при воздействии радиации и прогнозирование последствий его влияния на фертильность входят в число актуальных направлений современной репродуктологии.

В представленной работе животных подвергали острому однократному γ -облучению в дозах 1 и 6 Гр. Изучена динамика изменений морфологических показателей семенников, сперматозоидов и фертильности на разных стадиях сперматогенеза. Результаты исследования показали увеличение числа семенных канальцев со слущиванием половых клеток в просвет канальцев, десквамацией эпителиосперматогенного слоя, запуском семенных канальцев, уменьшение индекса сперматогенеза, снижение числа живых спермиев, их подвижности, увеличение количества патологических форм спермиев. Выявленные нарушения, соответственно, привели к увеличению общей эмбриональной и индуцированной постимплантационной смертности у самок, оплодотворенных облученными самцами на всех стадиях сперматогенеза. Наиболее выраженные изменения по изученным показателям наблюдали при воздействии облучения в летальной дозе.

Из анализа данных литературы следует, что даже низкодозовое излучение вызывает деструктивные изменения в семенниках, которые приводят к нарушению сперматогенеза [12–14]. Следует отметить, что в экспериментальных работах, как правило, отсутствует комплексный подход к изучению влияния облучения на репродуктивную функцию – нет анализа изменения фертильного потенциала при разной степени морфологических нарушений семенников и сперматозоидов. Важным шагом в данном направлении является выявление степени нарушения сперматогенеза, которое может привести к снижению оплодотворяющей способности сперматозоидов, временной или полной стерильности.

Процесс сперматогенеза в норме протекает при определенном балансе пролиферативной активности клеток, их дифференцировки и апоптоза [15, 16]. Падение индекса сперматогенеза может быть обусловлено торможением деления клеток, нарушением их дифференцировки, а также их гибелью. Наличие клеток с пикнотическими и апоптозоподобными ядрами обусловлено уплотнением хроматина, деформацией мембран ядер [17]. Образование многоядерных клеток свидетельствует о нарушении дифференцировки половых клеток и, соответственно, повреждении механизмов гистогенеза эпителиосперматогенного слоя. Многочисленные исследования показали, что основной причиной дегенерации герминативных клеток при воздействии ионизирующего излучения является апоп-

тоз [18]. Многоядерные клетки с проявлениями апоптоза, как правило, подлежат элиминации. Сперматиды с микроядрами и клетки с аномальными митозами, которые встречаются в семенных канальцах, свидетельствуют о мутагенном эффекте ионизирующего излучения. Причины снижения подвижности сперматозоидов у облученных животных в дозе 1 Гр (32–62-е сутки) и отсутствие подвижности при дозе 6 Гр могут быть разными: снижение андрогенной функции, неполное созревание клеток, патология головки и хвоста. Выявленные нами патоморфологические изменения в семенниках и сперматозоидах отразились на фертильном потенциале. В результате спаривания с самцами, облученными на всех стадиях сперматогенеза, у самок возрастает общая эмбриональная и индуцированная постимплантационная смертность. Следует отметить, что облучение в дозе 6 Гр вызывает временную стерильность на стадиях сперматид и сперматоцитов. Наблюдаемая стерильность вызвана не отсутствием сперматозоидов, а их неспособностью к оплодотворению. У самок, спаренных с облученными самцами, постимплантационная смертность эмбрионов, как правило, обусловлена мутагенным эффектом излучения на сперматогенез, доимплантационные потери в большинстве случаев связаны с морфофункциональными изменениями сперматогенных клеток негенетического характера, которые приводят к снижению оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что степень и глубина поражения эпителиосперматогенного слоя, сперматозоидов и, соответственно, фертильного потенциала являются дозозависимыми. Наблюдаемая временная стерильность у самцов, облученных в дозе 6 Гр, когда половые клетки находились на стадии сперматоцитов и сперматид, в большей степени связана с высоким уровнем патологических форм сперматозоидов и отсутствием подвижности, чем с их количеством. У облученных животных проявляется компенсаторно-восстановительная реакция со стороны сперматогенеза, однако следует отметить, что на 120-е сутки после облучения в дозе 1 Гр изучаемые показатели приходят к норме, а при дозе 6 Гр не достигают контрольных значений, что, соответственно, отразилось на достаточно высоком уровне общей эмбриональной смертности у самок. Таким образом, выявленные наиболее выраженные показатели морфофункционального состояния семенников и сперматозоидов у мышей, подвергнутых воздействию γ -облучения в летальной и сублетальной дозах, позволяют оценить фертильность и дают возможность разработки лечебно-профилактических мер.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

Литература/References

1. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S et al. Male infertility. *Lancet*. 2021;397(10271):319–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2.
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016.
3. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018;110(5):810–4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015.
4. Grewenig A, Schuler N, Rube CE. Persistent DNA damage in spermatogonial stem cells after fractionated low-dose irradiation of testicular tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;92(5):1123–31. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.04.033.
5. Григорьев Ю.Г. Значимость адекватной информации по оценке опасности ЭМП сотовой связи для здоровья населения (первая четверть XXI века). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020;60(5):532–540. DOI: 10.31857/S0869803120050045.
Grigoriev YuG. Significance of adequate information about the danger of cellular connection for health of population in the XXI century. *Radiation biology. Radioecology*. 2020;60(5):532–540 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0869803120050045.
6. Верещачко Г.Г., Чуешова Н.В., Цуканова Е.В., Бакиаева М.А. Радиационное поражение сперматогенных клеток и эпидидимальных сперматозоидов крыс линии Вистар после внешнего облучения. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2017;2:40–45. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=29185745> (получено 14.10.2022).
Vereschako GG, Chueshova NV, Tsukanova EV, Bakshayeva MA. Radiation injury spermatogenic cells and spermatozoa Wistar after external exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*. 2017;2:40–45 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=29185745> (accessed 14.10.2022).
7. Кульченко Н.Г., Демьяшкин Г.А. Морфологические изменения ткани яичек при бесплодии. *Андрология и генитальная хирургия*. 2016;17(3):38–42. DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.
Kulchenko NG, Demyashkin GA. Morphological changes in testicular tissue in infertility. *Andrology and genital surgery*. 2016;17(3):38–42 (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.
8. Первова Ю.В., Русакова Н.В., Старикова Т.В. Морфофункциональная характеристика сперматозоидов у субфертильных мужчин. *Морфологические ведомости*. 2021;29(2):80–83. DOI: 10.20340/mv-mn.2021.29(2).500.
Pervova YV, Rusakova NV, Starikova TV. The morphological and functional characteristics of spermatozoa in subfertile men. *Morphological newsletter*. 2021;29(2):80–83 (In Russ.). DOI: 10.20340/mv-mn.2021.29(2).500.
9. Мамина В.П. Радиационный риск эмбриональной гибели в различных стадиях развития половых клеток мышшей-самцов после низкодозного радиационного облучения. *Радиация и риск*. 2019;28(3):54–62. DOI: 10.21870/0131-3878-2019-28-3-54-62.
Mamina VP. Radiation risk of embryonic death at different stages of sex cells development following acute exposure of male mice to low dose ionizing radiation. *Radiation and risk*. 2019;28(3):54–62 (In Russ.). DOI: 10.21870/0131-3878-2019-28-3-54-62.
10. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1983;3(84):66–72. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=vshosv> (получено 14.10.2022).
Ukhov YuI, Astrakhansev AF. Morphometric methods in assessing the functional state of testes. *Archives of Anatomy, Histology and Embryology*. 1983;3(84):66–72 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=vshosv> (accessed 14.10.2022).
11. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия химических веществ при гигиеническом обосновании их ПДК в воде водных объектов. МУ 2926-83. Москва, 2021. Доступно по адресу: <https://meganorm.ru/Index2/1/4293750/4293750219.html> (получено 14.10.2022).
Methodological guidelines for studying the embryotoxic effect of chemical substances in the hygienic justification of their MPC in water bodies. MU 2926-83. Moscow, 2021 (In Russ.). Available from: <https://meganorm.ru/Index2/1/4293750/4293750219.html> (accessed 14.10.2022).
12. Меселмани М.Аль, Бакуев М.М., Шахбанов Р.К., Дибиров Т.М. Влияние однократного γ -облучения на морфологию семенников крыс. *Проблемы репродукции*. 2017;23(6):12–17. DOI: 10.17116/repro201723612-17.
Meselmani MAI, Bakuev MM, Shakhbanov RK, Dibirov TM. The impact of single external γ -irradiation on morphology of rat testis. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2017;23(6):12–17 (In Russ.). DOI: 10.17116/repro201723612-17.
13. Узбеков Д.Е., Хоши М., Чайжунусова Н.Ж., Шабдарбаева Д.М., Саякенов Н.Б. Гистоморфологические процессы в ткани семенников при воздействии ионизирующего излучения (обзор литературы). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;1(часть 2):258–263. DOI: 10.17513/mjpf.11180.
Uzbekov DE, Hoshi M, Chaizhumusova NG, Shabdarbaeva DM, Sayakenov NB. Histomorphological processes in the testicular tissue at ionizing radiation exposure (literature review). *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2017;1(part 2):258–263 (In Russ.). DOI: 10.17513/mjpf.11180.
14. Демьяшкин Г.А. Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. *Цитология*. 2018;60(3):208–218. DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.
Demyashkin GA. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya*. 2018;60(3):208–218 (In Russ.). DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.
15. Amanpour P, Khodarahmi P, Salehipour M. Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(3):349–58. DOI: 10.1007/s00210-019-01736-w.
16. Silva AM, Correia S, Casalta-Lopes JE, Mamede AC, Cavaco JE, Botelho MF et al. The protective effect of regucalcin against

- radiation-induced damage in testicular cells. *Life Sci.* 2016;164:31–41. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.003.
17. *Ma HR, Cao XH, Ma XL, Chen JJ, Chen JW, Yang H et al.* Protective effect of Liuweidihuang Pills against cellphone electromagnetic radiation-induced histomorphological abnormality, oxidative injury, and cell apoptosis in rat testes. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2015;21(8):737–41. PMID: 26442304.
18. *Демяшкин Г.А.* Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2021;10(2):40–49. DOI: 10.1088/CEM2021.10.2.40-49.
- Demyashkin GA.* Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(2):40–49 (In Russ.). DOI: 10.1088/CEM2021.10.2.40-49.

Информация об авторе

Вера Павловна Мамина – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института экологии растений и животных УрО РАН.

Author information

Vera P. Mamina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

<https://orcid.org/0000-0001-7579-5440>

Ультраструктура эпителия проксимальных канальцев почки при пероральном введении карбоната лития в условиях опухолевого роста

Н.П. Бгатова¹, А.М. Рахметова², Ш.М. Жумадина³, Ю.С. Таскаева¹, Е.Л. Завьялов⁴

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² НАО Торайгыров университет, Павлодар, Казахстан

³ НАО Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина, Астана, Казахстан

⁴ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Резюме. *Введение.* Несмотря на постоянно выявляемые новые биологические эффекты солей лития, их использование ограничено нефротоксическим действием. В последнее время появляются экспериментальные данные о регенераторных и протективных свойствах кратковременного введения лития при различных патологиях почки. Цель работы – оценить ультраструктурную организацию эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в условиях периферического опухолевого роста и перорального применения карбоната лития.

Материалы и методы. Работа проведена на мышцах – самцах линии СВА (n=20), разделенных на четыре группы: контрольная группа; «контроль + литий»; «опухоль»; «опухоль + литий». Для моделирования опухолевого роста в мышечной ткани бедра использовали клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы-29. Карбонат лития вводили перорально в дозе 125 мг/кг массы тела через день, начиная с третьего дня после инокуляции опухолевых клеток. Материал для проведения электронномикроскопического исследования (фрагменты почки) забирали на 30-е сутки развития опухоли.

Результаты. В сравнительном аспекте проанализирована ультраструктурная организация апикальной, околядерной зон и аутофагических структур эпителиоцитов проксимальных канальцев почки. Выявлено уменьшение численной плотности эндосом, плотных апикальных канальцев, объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикула, митохондрий и возрастание объемной плотности аутолизосом в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев почки животных с периферическим опухолевым ростом. При введении карбоната лития интактным животным показано возрастание объемной плотности свободных полисомальных комплексов рибосом. При использовании карбоната лития в условиях отдаленного роста опухоли отмечено увеличение численной плотности плотных апикальных канальцев и объемной плотности аутофагических структур в клетках проксимальных канальцев почки.

Заключение. Пероральное введение карбоната лития через день в течение месяца интактным животным не приводило к развитию деструктивных изменений эпителиоцитов проксимальных канальцев почки. Введение карбоната лития животным с периферическим опухолевым ростом, вероятно, через активацию аутофагии оказывало протективное действие на ультраструктурную организацию эпителиоцитов проксимальных канальцев почки.

Ключевые слова: периферическая опухоль, карбонат лития, проксимальные канальцы почки, ультраструктура, эндоцитоз, аутофагия

Для корреспонденции: Наталия Петровна Бгатова. E-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

Для цитирования: Бгатова Н.П., Рахметова А.М., Жумадина Ш.М., Таскаева Ю.С., Завьялов Е.Л. Ультраструктура эпителия проксимальных канальцев почки при пероральном введении карбоната лития в условиях опухолевого роста. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):42–52. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.4.42-52.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (№ NFWNR-2022-0012) и при финансовой поддержке гранта Центра международных программ Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (№ 6818).

Статья поступила 07.11.2022. Получена после рецензирования 21.11.2022. Принята в печать 12.12.2022.

Ultrastructure of the kidney proximal tubular epithelium during peroral administration of lithium carbonate in tumor growth

N.P. Bgatova¹, A.M. Rakhmetova², Sh.M. Zhumadina³, Iu.S. Taskaeva¹, E.L. Zavjalov⁴

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Toraigyrov University, Pavlodar, Kazakhstan

³ Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Astana, Kazakhstan

⁴ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. *Introduction.* Although new biological effects of lithium salts are being constantly discovered, they are still used as nephrotoxins. Recently, experimental data have appeared on regenerative and protective properties of short-term lithium administration in various kidney pathologies. The paper aimed to evaluate ultrastructural organization of the kidney proximal tubule cells in peripheral tumor growth and lithium carbonate peroral administration.

Materials and methods. The study was carried out on CBA male mice (n=20). We formed four groups, 5 animals each: “control”, “control + lithium”, “tumor” and “tumor + lithium.” To stimulate tumor growth in the thigh muscle tissue, we used a cell line of hepatocellular carcinoma-29. Lithium carbonate was administered *per os* at a dose of 125 mg/kg of body weight every other day, starting from day 3 after inoculation of tumor cells. Animals were sacrificed on day 30 of tumor development, and kidney fragments were collected for electron microscopy.

Results. We compared and analyzed ultrastructural organization of the apical and perinuclear zones as well as autophagic structures of the kidney proximal tubule cells. The animals with peripheral tumor growth showed decreased numerical density of endosomes and dense apical tubules as well as decreased volume density of the granular endoplasmic reticulum and mitochondria. In these animals, we also revealed increased volume density of autolysosomes in the cytoplasm of the epitheliocytes. The intact animals that received lithium carbonate demonstrated an increase in the volume density of free polysomal ribosome complexes. The animals that developed tumors and were administered lithium carbonate showed a growth in both numerical density of dense apical tubules and the volume density of autophagic structures.

Conclusion. Peroral administration of lithium carbonate to intact animals every other day for 30 days did not cause any destructive changes to the kidney proximal tubule cells. The administration of lithium carbonate to animals with peripheral tumor growth had a protective effect on the ultrastructural organization of the kidney proximal tubules cells (probably due to autophagy activation).

Keywords: peripheral tumor, lithium carbonate, renal proximal tubules, ultrastructure, endocytosis, autophagy

Corresponding author: Nataliya P. Bgatova. E-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

For citation: Bgatova N.P., Rakhmetova A.M., Zhumadina Sh.M., Taskaeva Iu. S., Zavjalov E.L. Ultrastructure of the kidney proximal tubular epithelium during peroral administration of lithium carbonate in tumor growth. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(4):42–52 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.42-52.

Funding. The study was carried out within the framework of the State Assignment to Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (No. NFWNR-2022-0012) and supported by the grant of Center for International Programs of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Project No. 6818).

Received 07.11.2022. **Received in revised form** 21.11.2022. **Accepted** 12.12.2022.

Введение

Научные публикации свидетельствуют о широком спектре биологических эффектов солей лития [1]. Интерес к литию связан прежде всего с тем, что для него выявлено несколько прямых мишеней: гликогенсинтаза киназа-3 (GSK-3) [2], инозитолмонофосфатаза и структурно родственные магнийзависимые фосфомоноэстеразы [3]. Известны нейротекторные свойства солей лития [4]. Исходя из механизмов действия лития, обсуждается его применение для воздействия на опухолевый рост [5]. В последнее время появляются данные о регенераторных эффектах лития [6]. Тем не

менее широкое использование лития ограничено его нефротоксическим действием и узким терапевтическим окном применения [7]. В то же время имеются данные о протективном действии на почки низких доз лития в условиях патологии [8].

Почки играют важную гомеостатическую роль, выполняя в организме множество функций [9]. Почки являются основным органом выделения, обладающим высоким кровотоком, что делает их чувствительными к метаболическим нарушениям [10]. Есть данные, что развивающаяся опухоль приводит к накоплению в крови токсичных продуктов обмена [11]. Чрезвычайно

важно сохранение гомеостаза почек в условиях злокачественного роста [12].

Эндоцитоз и аутофагия определены как основные взаимосвязанные процессы, направленные на сохранение гомеостаза клетки [13], и их эффективность важна для функции почки [14]. В литературе имеются данные о стимулирующем влиянии лития на процессы аутофагии [15, 16]. Механизм индукции аутофагии литием связывают с ингибированием активности инозитолмонофосфатазы [17]. Литий свободно фильтруется в клубочках и в значительной степени реабсорбируется в проксимальных канальцах [18].

Цель работы – оценить ультраструктурную организацию эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в условиях периферического опухолевого роста и перорального применения карбоната лития.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах – самцах линии СВА ($n=20$) массой 18–20 граммов в возрасте 3 месяцев на базе ЦКП «SPF виварий» СО РАН. Работу с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986). На проведение исследования получено разрешение этического комитета НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (протокол № 140 от 26.04.2018).

Было сформировано четыре группы животных по пять особей в каждой: группа интактных животных («контроль»), группа интактных животных, получавших перорально карбонат лития («контроль + литий»), группа животных с опухолевым ростом («опухоль») и группа животных с опухолевым ростом, получавших перорально карбонат лития («опухоль + литий»). В связи с тем, что гепатоцеллюлярная карцинома является частным вариантом общей концепции канцерогенеза, определяющей злокачественный рост любой локализации [19], для моделирования опухолевого процесса использовали клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы-29 (Г-29), полученную и верифицированную сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН и предоставленную для наших исследований [20]. Животных содержали на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Клетки Г-29 вводили в дозе 2×10^6 клеток в 100 мкл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия в мышцу правого бедра. Карбонат лития («Завод редких металлов», Россия) вводили перорально в дозе 125 мг/кг веса через день, начиная с третьего дня после инокуляции опухолевых клеток. Данная доза введения была выбрана на основании ранее полученных экспериментальных данных, свидетельствующих о ее противоопухолевом действии и концентрации в крови, не превышающей существующие нормы накопления лития [5]. Забор фрагментов почки проводили на 30-е сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента методом краниоцервикальной дислокации.

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) образцы почки фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1% растворе тетраоксида осмия (OsO_4) на фосфатном буфере pH 7,4, дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия), окрашивали толуидиновым синим, с помощью светового микроскопа Leica DME (Leica Microsystems, Германия) выбирали образцы для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала изготавливали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца. Цифровые фотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы Image J (National Institute of Health, США). На цифровых микрофотографиях эпителиоцитов проксимальных канальцев почки при $\times 30\,000$ подсчитывали численные и объемные плотности цитоплазматических органелл в разных зонах клетки (по 25 микрофотографий каждой зоны клетки на группу).

Численную плотность везикулярных структур (количество везикул в тестовой площади) определяли с помощью закрытой тестовой системы площадью $2,37 \text{ мкм}^2$, которую накладывали на апикальную зону цитоплазмы проксимальных эпителиоцитов. Объемные плотности митохондрий, гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибосом, аутофагосом, аутолизосом подсчитывали с помощью закрытой тестовой системы площадью $13,7 \text{ мкм}^2$, состоящей из 324 точек. Расстояние между точками составляло 0,1 мкм.

Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы Statistica Version 10 (StatSoft, США). Для проверки вариационных рядов на нормальность применяли статистический критерий Колмогорова–Смирнова. Выборки в настоящем исследовании не отвечали критериям нормального распределения, поэтому описание количественных характеристик представляли в виде медианы и первого и третьего квартилей – Me (25%; 75%). Значимость различий между изучаемыми выборками определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследовали структурную организацию эпителиоцитов проксимальных канальцев почки (рис. 1). При анализе апикальной зоны клеток было выявлено, что число плотных апикальных канальцев больше, чем эндосом, во всех исследованных группах (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1 | Table 1

Результаты морфометрии апикальной зоны эпителиоцитов проксимальных канальцев почки, Me (25; 75) |
The results of morphometry of the apical zone of the kidney proximal tubules epitheliocytes, Me (25;75)

Группы Groups	Эндосомы N_A Endosomes N_A	Плотные апикальные канальцы N_A Dense apical tubules N_A	Суммарное число везикулярных структур N_A Total number of vesicular structures N_A	Соотношение эндосом и плотных апикальных канальцев Ratio of endosomes to dense apical tubules
Контроль Control n=25	6,0 (5,0; 7,5)	9,0 (8,0; 12,0)	16,0 (14,0; 18,0)	0,63 (0,5; 0,88)
Контроль + литий Control + lithium n=25	6,0 (5,0; 7,0)	8,0 (8,0; 9,0)	14,0 (13,0; 16,0) *p=0,001	0,69 (0,57; 0,79)
Опухоль Tumor n=25	4,0 (3,0; 5,0) *p=0,0001	5,0 (4,0; 6,0) *p=0,0001	9,0 (8,0; 10,0) *p=0,0001	0,80 (0,67; 0,83) *p=0,009
Опухоль + литий Tumor + lithium n=25	7,0 (6,0; 8,0) #p=0,0001	10,5 (9,0; 13,0) #p=0,0001	18,5 (15,0; 20,0) #p=0,0001	0,68 (0,62; 0,75) #p=0,039

N_A – численная плотность структур; n=25 – количество цифровых микрофотографий; статистически значимые отличия: * – по сравнению с соответствующими значениями в группе «контроль», # – по сравнению с соответствующими значениями в группе «опухоль»
 N_A – the numerical density of structures; n=25 – number of digital micrographs, statistically significant differences: * – from corresponding values in the control group, # – from corresponding values in the group with tumors and no lithium administration

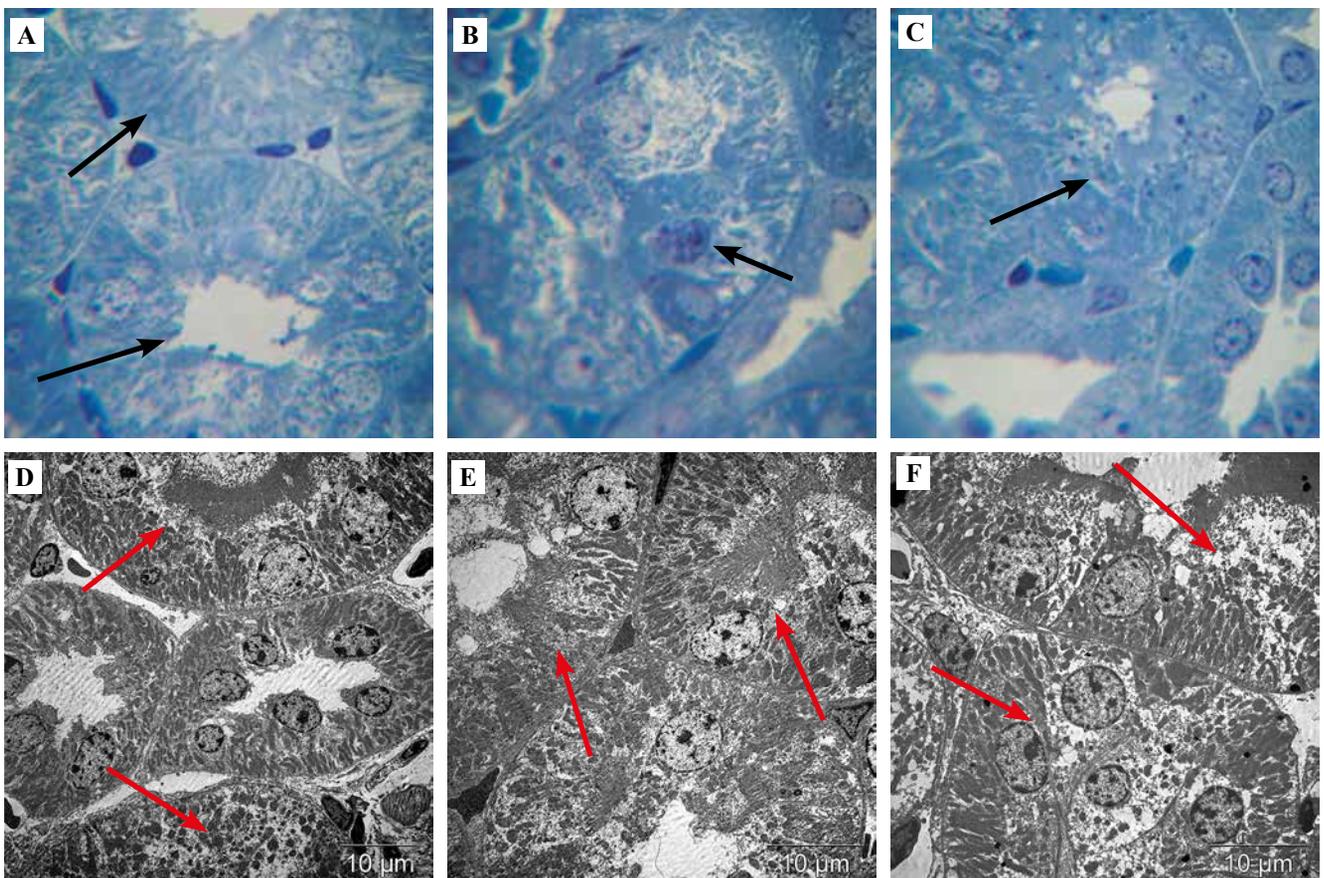


Рис. 1. Структура проксимальных канальцев почки мышей линии СВА (стрелки).

А, D – в группе контроля, В, Е – у животных из группы «опухоль», С, F – у животных из группы «опухоль + литий».

А, В, С – окраска толуидиновым синим, $\times 1000$ D, E, F – ТЭМ, $\times 3000$, масштабный отрезок – 10 мкм

Fig. 1. Structure of the kidney proximal tubules of CBA mice (arrows).

А, D – in the control group, В, Е – in the animals with tumors without lithium administration, С, F – in the animals with tumors and administered lithium. А, В, С – toluidine blue stain $\times 1000$ D, E, F – TEM, $\times 3000$, scale bar – 10 μm

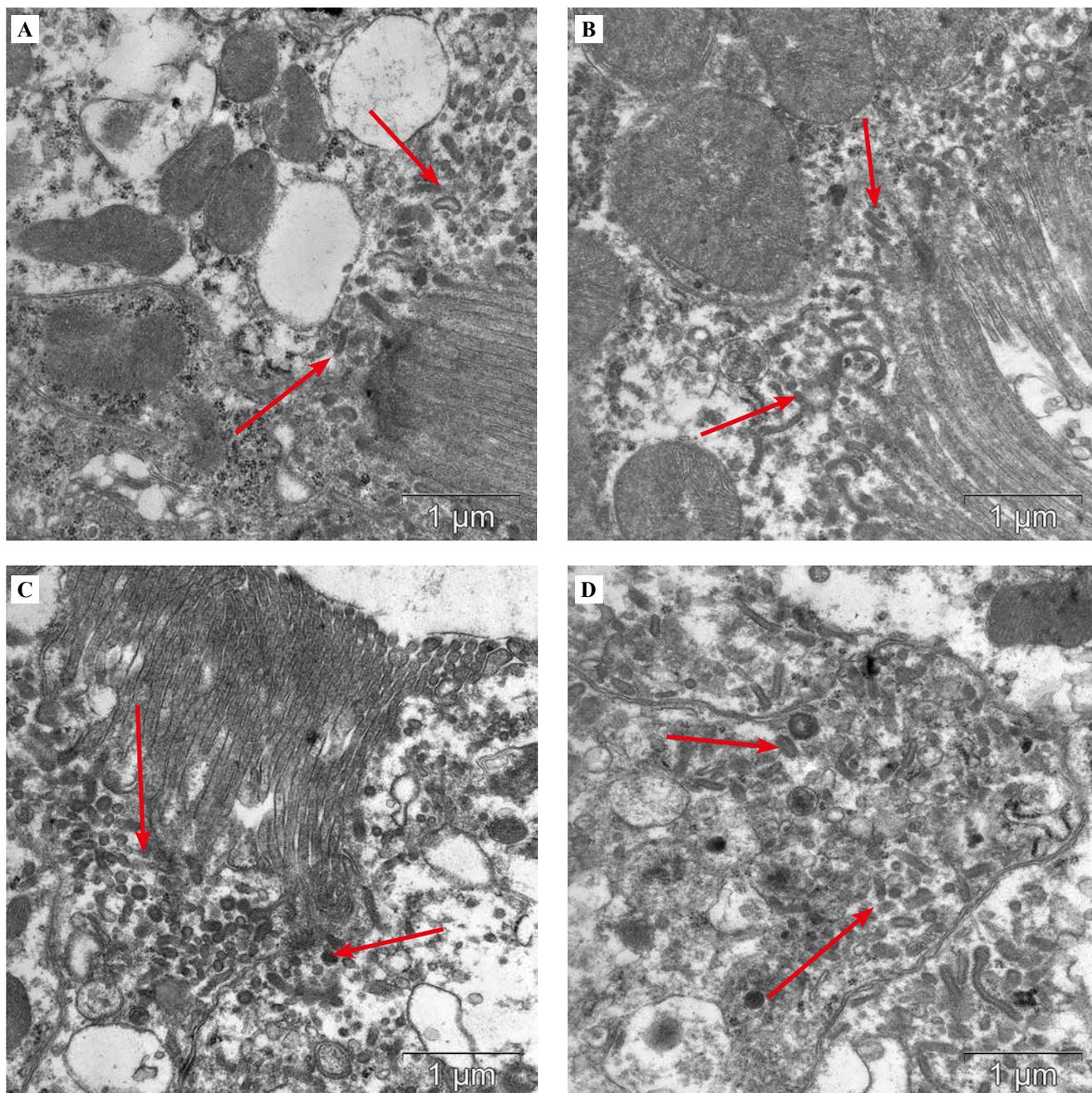


Рис. 2. Структурная организация апикальной зоны клеток проксимальных канальцев почки мышей линии СВА. Эндосомы и плотные апикальные каналцы (стрелки).

А – интактный контроль, В – группа «опухоль», С – группа «контроль + литий». D – группа «опухоль + литий». ТЭМ, масштабный отрезок – 1 мкм

Fig. 2. Structural organization of the apical zone of the kidney proximal tubule cells of CBA mice. Endosomes and dense apical tubules (arrows).

A – in the control group, B – in the animals with tumors without lithium administration, C – in the animals without tumors and with administered lithium, D – in the animals with tumors and administered lithium. TEM, scale bar – 1 μm

При введении карбоната лития интактным животным численные плотности эндосом и плотных апикальных канальцев достоверно не изменялись. Снижение численной плотности эндосом и плотных апикальных канальцев и общей численной плотности эндоцитарных структур наблюдали в группе животных с опухолевым ростом. При этом численная плотность эндосом была меньше на

33%, а плотных апикальных телец на 45% по сравнению с соответствующими показателями в контроле.

В апикальной зоне клеток проксимального отдела нефрона в группе животных «опухоль + литий» имела место тенденция к возрастанию численной плотности как эндосом, так и плотных апикальных телец, при этом их соотношение не отличалось от соответствующей

величины в контроле (табл. 1). По сравнению с клетками животных с опухолевым ростом на 75% была большей численная плотность эндосом и в 2 раза увеличено число плотных апикальных канальцев (табл. 1).

При исследовании ультраструктурной организации околядерной зоны клеток проксимальных

канальцев выявлено, что при введении перорально карбоната лития интактным животным в 2 раза возрастала объемная плотность свободных полисомальных комплексов рибосом, содержание в цитоплазме остальных органелл достоверно не изменялось (табл. 2, рис. 3 А, В).

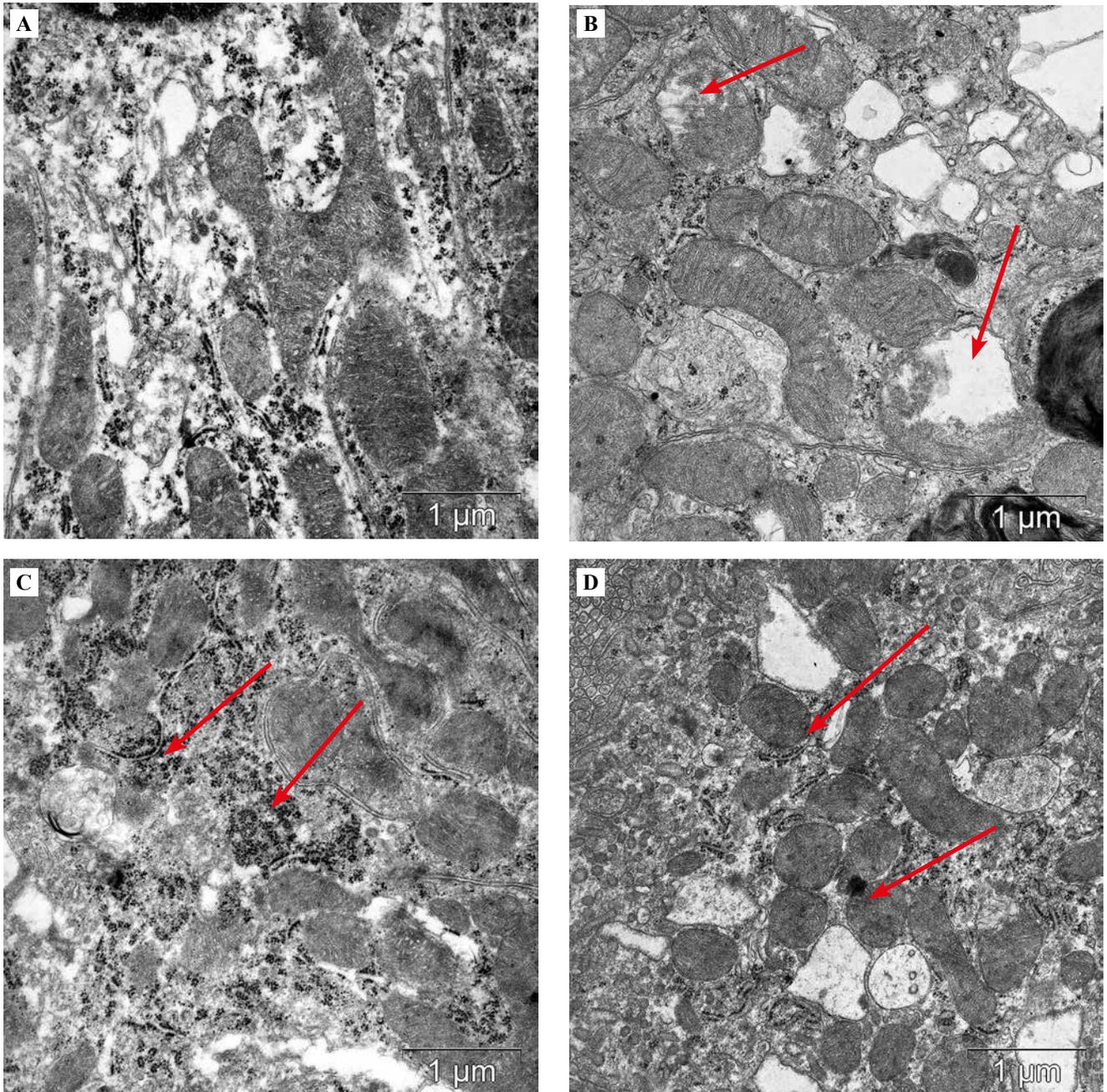


Рис. 3. Структурная организация околядерной зоны клеток проксимальных канальцев почки мышей линии СВА.

А – интактный контроль, В – группа «опухоль», набухание митохондрий и нарушение структуры крист (стрелки), С – группа «контроль + литий», большое содержание свободных полисомальных комплексов рибосом (стрелки),

Fig. 3. Structural organization of the perinuclear zone of the kidney proximal tubule cells of CBA mice.

Д – группа «опухоль + литий», большое содержание мелких митохондрий (стрелки). ТЭМ, масштабный отрезок – 1 мкм

A – in the control group, B – in the animals with tumors without lithium administration, swelling of mitochondria and disruption of the cristae structure (arrows), C – in the animals without tumors and with administered lithium, numerous free polysomal ribosome complexes (arrows), D – in the animals with tumors and administered lithium, numerous small mitochondria (arrows). TEM, scale bar – 1 µm

Таблица 2 | Table 2

Результаты морфометрии околядерной зоны эпителиоцитов проксимальных канальцев почки, Me (25; 75) |
Results of morphometry of the perinuclear zone of the kidney proximal tubules epithelial cells, Me (25; 75)

Группы Groups	Митохондрии Vv Mitochondria Vv	Митохондрии N _A Mitochondria N _A	ЭПР Vv EPR Vv	Рибосомы Vv Ribosomes Vv
Контроль Control n=25	9,0 (8,0; 10,0)	10,0 (9,0; 11,0)	4,0 (3,0; 5,0)	2,2 (2,0; 3,0)
Контроль + литий Control + lithium n=25	9,0 (8,0; 10,0)	10,0 (9,0; 11,0)	3,0 (3,0; 4,0)	4,8 (3,5; 5,0) *p=0,0001
Опухоль Tumor n=25	7,0 (6,0; 8,0) *p=0,0001	9,0 (8,0; 9,0)	2,1 (2,0; 3,0) *p=0,0001	2,0 (1,5; 2,0)
Опухоль + литий Tumor + lithium n=25	8,0 (7,0; 9,0)	12,0 (10,0; 13,0)	2,0 (1,9; 3,00) *p=0,0001	2,0 (1,5; 2,0)

Vv – объемная плотность структур (%); N_A – численная плотность структур; n=25 – количество цифровых микрофотографий,
* – статистически значимые отличия по сравнению с соответствующими значениями в группе «контроль»

Vv – the volume density of structures (%); N_A – the numerical density of structures; n=25 – number of digital micrographs,
* – statistically significant differences from corresponding values in the control group

В цитоплазме эпителиоцитов животных из группы «опухоль» отмечали снижение объемной плотности митохондрий на 22%, их численная плотность при этом достоверно не изменялась (табл. 2). Происходило набухание митохондрий и, как следствие, увеличение их размеров и нарушение структуры крист (рис. 3 В).

При введении перорально карбоната лития животным с опухолевым ростом имела место тенденция к снижению объемной плотности митохондрий и возрастанию их численной плотности, что, по-видимому, являлось следствием деления данных органелл, так как отмечали наличие большого количества мелких

митохондрий (табл. 2, рис. 3 D). Объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикула была снижена на 50% по сравнению с контролем (табл. 2).

При исследовании ультраструктурной организации аутофагических структур в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев выявлено, что при введении карбоната лития интактным животным не происходило изменения количества лизосомальных структур. В группе животных с опухолевым ростом отмечено увеличение на 95% аутолизосом по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3 | Table 3

Результаты морфометрии аутофагических структур эпителиоцитов проксимальных канальцев почки, Me (25; 75) |
The results of morphometry of the autophagic structures of the kidney proximal tubules epithelial cells, Me (25; 75)

Группы Groups	Аутофагосомы Vv Autophagosomes Vv	Лизосомы Vv Lysosomes Vv	Аутолизосомы Vv Autolysosomes Vv
Контроль Control n=25	0,25 (0,21; 0,29)	0,21 (0,19; 0,23)	0,19 (0,17; 0,20)
Контроль + литий Control + lithium n=25	0,23 (0,22; 0,24)	0,27 (0,25; 0,29)	0,19 (0,18; 0,22)
Опухоль Tumor n=25	0,20 (0,18; 0,22)	0,29 (0,28; 0,30)	0,37 (0,36; 0,44) *p=0,0008
Опухоль + литий Tumor + lithium n=25	0,32 (0,31; 0,34) *p=0,0001 #p=0,0001	0,50 (0,48; 0,51) *p=0,0001 #p=0,0001	0,43 (0,42; 0,46) *p=0,0001

Vv – объемная плотность структур (%); n=25 – количество цифровых микрофотографий, статистически значимые отличия:

* – по сравнению с соответствующими значениями в группе «контроль», # – по сравнению с соответствующими значениями в группе «опухоль»

Vv – the volume density of structures (%); n=25 – number of digital micrographs, statistically significant differences: * – from corresponding values in the control group, # – from corresponding values in the group with tumors and no lithium administration

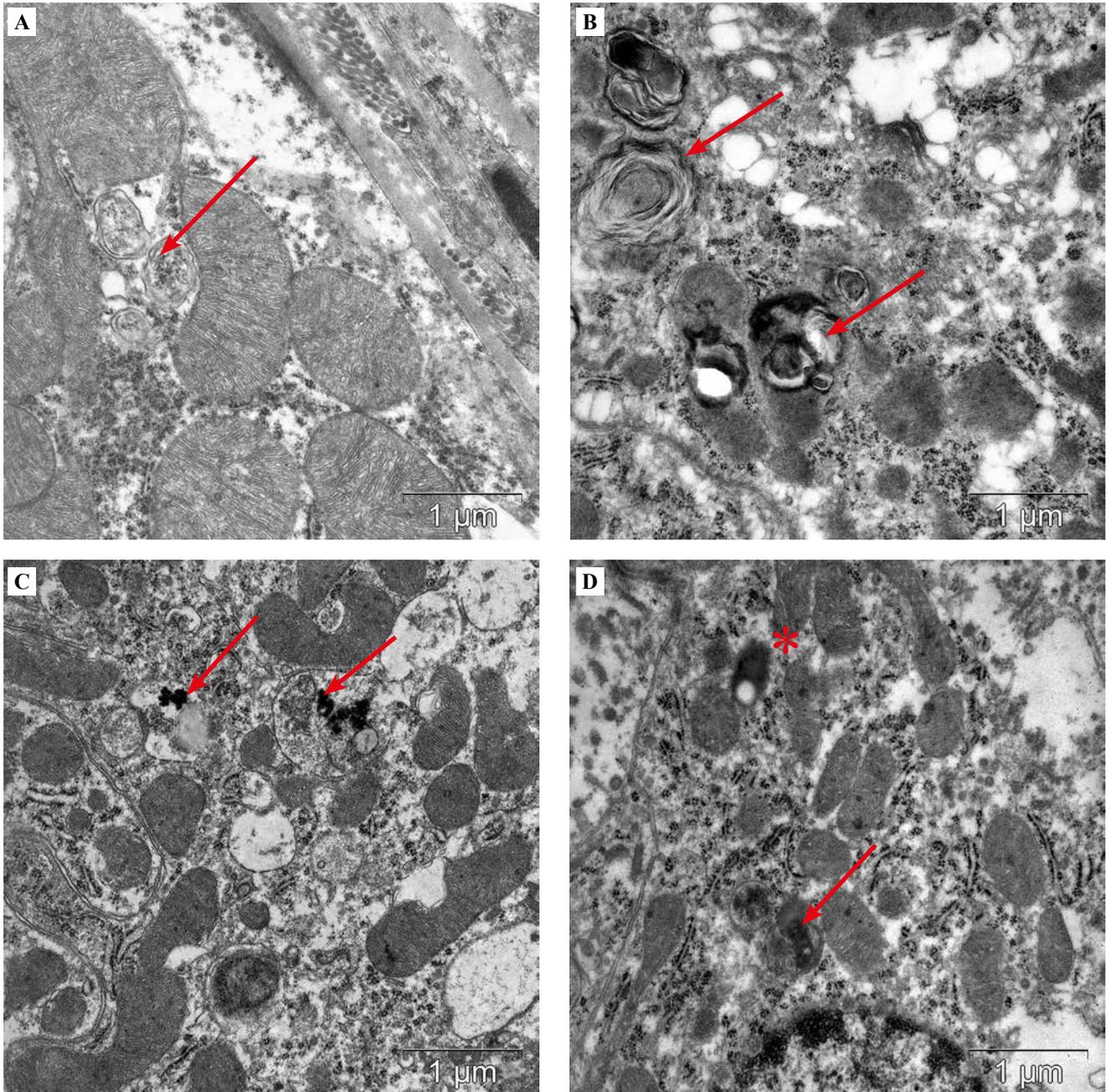


Рис. 4. Аутофагические структуры в цитоплазме клеток проксимальных канальцев почки мышей линии СВА.

А – интактный контроль, аутофагосомы с фрагментами цитоплазмы (стрелка), В – группа «опухоль», лизосомы и миелиновые тельца (стрелки), С – группа «опухоль + литий», аутофагосомы (стрелки), D – группа «опухоль + литий», лизосома (звездочка) и аутолизосомы (стрелка). ТЭМ, масштабный отрезок – 1 мкм

Fig. 4. Autophagic structures in the cytoplasm of the kidney proximal tubule cells of CBA mice.

A – in the control group, autophagosomes with fragments of the cytoplasm (arrow), B – in the animals with tumors, lysosomes and myelin bodies (arrows), C – in the animals with tumors and administered lithium, autophagosomes (arrows), D – in the animals with tumors and administered lithium, lysosome (asterisk) and autolysosomes (arrow). TEM, scale bar – 1 µm

При добавлении карбоната лития к рациону животных с опухолевым ростом значительно увеличивалась объемная плотность всех аутофагических структур (табл. 3). Морфометрический анализ клеток проксимальных канальцев почек показал, что в группе животных с опухолевым ростом, получавших литий, объемная плотность аутофагосом была больше на 28%,

чем величина соответствующего показателя в группе «контроль», и на 60%, чем в группе «опухоль». При этом объемная плотность лизосом увеличилась в 2 раза по сравнению с интактным контролем и на 72% по сравнению с животными с опухолевым ростом (табл. 3, рис. 4). Объемная плотность аутолизосом возросла в 2 раза по сравнению с контролем и достоверно

не отличалась от соответствующего показателя у животных с опухолевым ростом.

Обсуждение

В эпителиоцитах проксимальных канальцев почки происходит реабсорбция белков из клубочкового фильтрата за счет рецепторопосредованного эндоцитоза. Апикальный эндоцитарный аппарат проксимальных клеток состоит из окаймленных везикул, эндосом, лизосом и плотных апикальных канальцев. Поступившие в клетку путем эндоцитоза белки транспортируются эндосомальной системой в лизосомы, где деградируют, а рецепторы рециркулируют в апикальную плазматическую мембрану через плотные апикальные канальцы [21].

Имеются данные, что активность апикального эндоцитоза может проявляться морфологически различимыми изменениями в эндоцитарных компартментах, что отражает изменение способности к интернализации [22]. Следовательно, полученные нами ультраструктурные изменения в содержании эндосом и плотных апикальных канальцев в эпителиоцитах проксимального отдела почки могут свидетельствовать о снижении реабсорбции и рециркуляции белков в условиях периферического опухолевого роста и коррекции этого процесса при введении карбоната лития.

Известно, что клетки проксимальных канальцев в физиологических условиях обладают низким уровнем аутофагии. Однако базальная аутофагия необходима для поддержания их функции [23]. Показано, что за счет аутофагии в проксимальных канальцах происходит удаление поврежденных белков и органелл [24]. Деградируемый в лизосомах материал повторно используется в качестве строительных блоков, необходимых для поддержания клеточного гомеостаза, что позволяет рассматривать аутофагию как защитный механизм [25].

В нашем эксперименте в условиях токсической нагрузки на почки, связанной с периферическим опухолевым ростом, были получены данные об увеличении объемной плотности аутолизосом и уменьшении объемной плотности митохондрий и мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, свидетельствующие о возрастании катаболических процессов в клетках проксимальных канальцев. Тем не менее активность аутофагии, видимо, была недостаточной, так как в клетках сохранялись органеллы с деструктивными изменениями. В частности, митохондрии имели структурные признаки набухания со снижением содержания крист.

При введении карбоната лития в условиях отдаленного опухолевого роста в клетках проксимальных канальцев отмечалось возрастание объемной плотности всех типов аутофагических структур. При этом не отмечалось достоверных изменений в содержании и структуре митохондрий по сравнению с контролем и наблюдались достоверно большие значения численной плотности эндосом и плотных апикальных канальцев по сравнению и животными группы «опухоль».

Известно, что аутофагия в почке осуществляется через внутриклеточную лизосомную деградацию и рециклинг и необходима для поддержания баланса гомеостаза клетки и рециркуляции белка [26]. Выявленные нами данные об отсутствии различий в значениях численной плотности эндосомальных структур в группе «опухоль + литий» от соответствующих величин в контроле, по-видимому, связаны с активацией аутофагии литием, обусловившей сохранение процессов реабсорбции и рециркуляции белка в клетках проксимальных канальцев.

Ранее нами на этой же экспериментальной модели при пероральном введении карбоната через день в дозе 125 мг/кг массы тела было определено накопление лития в крови и органах экспериментальных животных с опухолевым ростом и показано, что его концентрации при введении в течение месяца не превышают допустимые для лития значения и составляют в крови $0,007 \pm 0,0005$ мМ/л и в почках $0,025 \pm 0,005$ мМ/кг [27].

Литий имеет чрезвычайно низкий терапевтический индекс, и важно тщательно контролировать его уровень в плазме. Известно, что диапазон эффективных доз лития при лечении нейродегенеративных заболеваний составляет 0,6–1,0 мМ в сыворотке и значения более 1,5 мМ могут быть токсичными, а уровни лития в сыворотке 1,5–2,0 мМ могут оказывать легкое и обратимое токсическое воздействие на почки, печень, сердце, эндокринные железы [28]. Концентрации лития выше 1,2 ммоль/л потенциально токсичны и могут быть смертельными [29].

Известно, что литий всасывается в основном в желудке и выводится почками. Эффект его действия заключается в снижении способности почек реабсорбировать воду, и степень поражения почек зависит от продолжительности непрерывного воздействия лития [28].

Показано, что период полувыведения лития равен примерно 24 часам [30]. Согласно нашим данным, в условиях введения лития через день в течение 30 дней даже в значительной дозе не наблюдается эффекта его избыточного накопления [27]. Сходные данные были получены другими авторами, использовавшими такую же дозу лития при моделировании рака толстой кишки [5]. Следовательно, введение карбоната лития через день в течение месяца позволяет избежать чрезмерного накопления лития в крови и почках, не оказывает повреждающего действия на структуру почек и способствует поддержанию структурной целостности клеток проксимальных канальцев через активацию аутофагии и эндоцитоза.

Заключение

В условиях отдаленного роста опухоли в апикальной части клеток проксимальных канальцев почки отмечено уменьшение численной плотности эндосом и плотных апикальных канальцев. В перинуклеарном компартменте клеток проксимальных канальцев на-

блюдались набухание митохондрий и деструкция крист. Была снижена объемная плотность митохондрий, мембран гранулярной эндоплазматической сети и увеличена объемная плотность аутолизосом.

Пероральное введение карбоната лития через день в течение месяца интактным животным не приводило к развитию деструктивных изменений эпителиоцитов проксимальных канальцев почки. Введение карбоната лития животным с периферическим опухолевым ростом оказывало протективное действие на ультраструктурную организацию эпителиоцитов проксимальных канальцев почки, что, по-видимому, было обусловлено активацией аутофагии. Полученные результаты могут быть полезны в разработке поддерживающей комплексной терапии пациентов с онкологическими заболеваниями и сопутствующим поражением почек.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.П. Бгатова, Ш.М. Жумадина, Е.Л. Завьялов.
Сбор и обработка материала – А.М. Рахметова, Ю.С. Таскаева, Н.П. Бгатова.
Написание текста – Н.П. Бгатова.
Редактирование – Н.П. Бгатова, Ю.С. Таскаева, Е.Л. Завьялов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.P. Bgatova, Sh.M. Zhumadina, E.L. Zavjalov.
Collected the data and performed the analysis – A.M. Rakhmetova, Yu.S. Taskaeva, N.P. Bgatova.
Wrote the paper – N.P. Bgatova.
Edited the manuscript – N.P. Bgatova, Yu.S. Taskaeva, E.L. Zavjalov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Snitow ME, Bhansali RS, Klein PS.* Lithium and therapeutic targeting of GSK-3. *Cells.* 2021;10(2):255. DOI: 10.3390/cells10020255.
2. *Costemale-Lacoste JF, Guilloux JP, Gaillard R.* The role of GSK-3 in treatment-resistant depression and links with the pharmacological effects of lithium and ketamine: A review of the literature. *Encephale.* 2016;42(2):156–64. DOI: 10.1016/j.encep.2016.02.003.
3. *Kraft L, Roe SM, Gill R, Atack JR.* Co-crystallization of human inositol monophosphatase with the lithium mimetic L-690,330. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2018;74(Pt 10):973–8. DOI: 10.1107/S2059798318010380.
4. *Won E, Kim YK.* An oldie but goodie: Lithium in the treatment of bipolar disorder through neuroprotective and neurotrophic mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2679. DOI: 10.3390/ijms18122679.
5. *Maeng YS, Lee R, Lee B, Choi SI, Kim EK.* Lithium inhibits tumor lymphangiogenesis and metastasis through the inhibition of TGFβ1 expression in cancer cells. *Sci Rep.* 2016;6:20739. DOI: 10.1038/srep20739.
6. *Zhao YJ, Qiao H, Liu DF, Li J, Li JX, Chang SE et al.* Lithium promotes recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2022;17(6):1324–33. DOI: 10.4103/1673-5374.327348.
7. *Davis J, Desmond M, Berk M.* Lithium and nephrotoxicity: A literature review of approaches to clinical management and risk stratification. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):305. DOI: 10.1186/s12882-018-1101-4.
8. *Gong R, Wang P, Dworkin L.* What we need to know about the effect of lithium on the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(6):F1168–71. DOI: 10.1152/ajprenal.00145.2016.
9. *Glasscock RJ, Rule AD.* Aging and the kidneys: Anatomy, physiology and consequences for defining chronic kidney disease. *Nephron.* 2016;134(1):25–9. DOI: 10.1159/000445450.
10. *Sakul A, Ozansoy M, Elibol B, Ayla Ş, Günel MY, Yozgat Y et al.* Squalene attenuates the oxidative stress and activates AKT/mTOR pathway against cisplatin-induced kidney damage in mice. *Turk J Biol.* 2019;43(3):179–88. DOI: 10.3906/biy-1902-77.
11. *Sakhno LA, Sarnatskaya VV, Yushko LA, Snezhkova EA, Bardakhivskaya KI, Shevchuk OO.* Adsorptive therapy as a modifier for tumor-host interaction. *Exp Oncol.* 2019;41(3):254–7. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13576.
12. *Гаркуша Т.А., Быханова Е.А., Хоржевский В.А., Ганноев С.В., Фирсов М.А., Ивлиев С.В.* Частота встречаемости гломерулопатий при новообразованиях почек в Красноярске. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(3):15–21. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.15-21.
13. *Garkusha TA, Bykhanova EA, Khorzhevskii VA, Gappoev SV, Firsov MA, Ivliev SV.* The incidence of glomerulopathies in kidney neoplasms in Krasnoyarsk. Clinical and experimental morphology. 2022;11(3):15–21 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.15-21.
14. *Dikic I.* Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:193–224. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.
15. *Qi YY, Zhou XJ, Cheng FJ, Hou P, Ren YL, Wang SX et al.* Increased autophagy is cytoprotective against podocyte injury induced by antibody and interferon-α in lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(12):1799–809. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-213028.
16. *Motoi Y, Shimada K, Ishiguro K, Hattori N.* Lithium and autophagy. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(6):434–42. DOI: 10.1021/cn500056q.
17. *Taskaeva I, Gogaeva I, Shatruck A, Bgatova N.* Lithium enhances autophagy and cell death in skin melanoma: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Microsc Microanal.* 2022;28(5):1703–11. DOI: 10.1017/S1431927622000745.
18. *Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M et al.* Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.* 2005;170(7):1101–11. DOI: 10.1083/jcb.200504035.
19. *Alsady M, Baumgarten R, Deen PM, Groot T.* Lithium in the kidney: Friend and foe? *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(6):1587–95. DOI: 10.1681/ASN.2015080907.
20. *Шапошников А.В., Кут О.И., Непомнящая Е.М., Юрьева Е.А.* Гепатоцеллюлярный рак. Современные аспекты канцеро-

- генеза. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(4):5–15. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.5-15.
- Shaposhnikov AV, Kit OI, Nepomnyaschaya EM, Yurieva EA.* Hepatocellular cancer. Current aspects of carcinogenesis. Clinical and experimental morphology. 2022;11(4):5–15 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.5-15.
20. *Kaledin VI, Zhukova NA, Nikolin VP, Popova NA, Beliaev MD, Baginskaya NV et al.* Hepatocarcinoma-29, a metastasizing transplantable mouse tumor inducing cachexia. *Bull Exp Biol Med.* 2009;148(6):903–8. DOI: 10.1007/s10517-010-0848-9.
21. *Schreiber A, Theilig F, Schweda F, Höcherl K.* Acute endotoxemia in mice induces downregulation of megalin and cubilin in the kidney. *Kidney Int.* 2012;82(1):53–9. DOI: 10.1038/ki.2012.62.
22. *Eshbach ML, Weisz OA.* Receptor-mediated endocytosis in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:425–48. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034234.
23. *Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z.* Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(9):489–508. DOI: 10.1038/s41581-020-0309-2.
24. *Wang Z, Choi ME.* Autophagy in kidney health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):519–37. DOI: 10.1089/ars.2013.5363.
25. *Choi AM, Ryter SW, Levine B.* Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368(7):651–62. DOI: 10.1056/NEJMra1205406.
26. *Lin TA, Wu VC, Wang CY.* Autophagy in chronic kidney diseases. *Cells.* 2019;8(1):61. DOI: 10.3390/cells8010061.
27. *Bgatova N, Solovjeva O, Shatskaya S, Taskaeva Iu, Khot-skin N, Isupov V et al.* Neuroprotective effects of lithium carbonate in conditions of tumor growth. Proceedings of the 11th International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB). 2018 Aug 20–25; Novosibirsk: Russia. 2018;51–55. DOI: 10.1109/CSGB.2018.8544772.
28. *Albert U, De Cori D, Blengino G, Bogetto F, Maina G.* Lithium treatment and potential long-term side effects: A systematic review of the literature. *Riv Psichiatr.* 2014;49(1):12–21. DOI: 10.1708/1407.15620.
29. *Sheikh M, Qassem M, Triantis IF, Kyriacou PA.* Advances in therapeutic monitoring of lithium in the management of bipolar disorder. *Sensors (Basel).* 2022;22(3):736. DOI: 10.3390/s22030736.
30. *Malhi GS, Tanious M, Das P, Berk M.* The science and practice of lithium therapy. *Aust N Z J Psychiatry.* 2012;46(3):192–211. DOI: 10.1177/0004867412437346.

Информация об авторах

Наталья Петровна Бгатова – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории ультраструктурных исследований научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН.

Асель Мурзагельдиновна Рахметова – старший преподаватель кафедры биологии и экологии Торайгырова университета.

Шолпан Молдажановна Жумадина – доктор биологических наук, профессор, доцент кафедры биологии, защиты и карантина растений Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина.

Юлия Сергеевна Таскаева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН.

Евгений Леонидович Завьялов – кандидат биологических наук, руководитель Центра неклинических испытаний ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН.

Author information

Nataliya P. Bgatova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory of Ultrastructural Research, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Science. <https://orcid.org/0000-0002-4507-093X>

Asel M. Rakhmetova – Senior Lecturer, Department of Biology and Ecology, Toraigyrov University. <https://orcid.org/0000-0002-3221-958X>

Sholpan M. Zhumadina – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Associate Professor, Department of Biology, Plant Protection and Quarantine, Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University. <https://orcid.org/0000-0002-4792-7466>

Iuliia S. Taskaeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Ultrastructural Research, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Science. <https://orcid.org/0000-0002-2812-2574>

Evgenii L. Zavjalov – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Non-clinical Testing Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Science. <https://orcid.org/0000-0002-9412-3874>

Экспрессия ренина и ангиотензинпревращающего фермента 2 в матке и плаценте при иммунозависимых и ассоциированных с преэклампсией спонтанных абортах у мышей

К.А. Артемьева, И.И. Степанова, Н.В. Низяева, М.Н. Болтовская,
И.М. Богданова, А.А. Степанов, М.В. Кондашевская, Е.А. Пономаренко

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

Резюме. *Введение.* Самопроизвольный аборт и преэклампсия (ПЭ) являются наиболее частыми акушерскими патологиями. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и система иммунитета одними из первых распознают беременность и играют ключевую роль в ее поддержании. Дисфункция РААС является одной из причин недостаточной инвазии трофобласта и нарушения ремоделирования спиральных артерий, приводящих к развитию ПЭ. Помимо циркулирующих компонентов РААС существуют локальные РААС, в том числе маточно-плацентарная. Цель исследования – анализ экспрессии ренина и ангиотензинпревращающего фермента 2 в плаценте и матке при ассоциированных с ПЭ спонтанных и иммунозависимых абортах у мышей.

Материалы и методы. Физиологическую аллогенную беременность моделировали спариванием ♀СВА × ♂Valb/c, спонтанные аборт, ассоциированные с ПЭ, – ♀СВА × ♂DBA/2, индуцированные аборт – внутрибрюшинным введением β-гептилгликозида мурамилдипептида самкам СВА, оплодотворенным самцами Valb/c, на 5-й и 7-й дни гестации (ДГ). На 14-й ДГ по завершении формирования плаценты мышей выводили из эксперимента. Проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование матки и плаценты с использованием кроличьих моноклональных антител к ренину и ангиотензинпревращающему ферменту 2 (АПФ2). Оценивали характер распределения ренин- и АПФ2⁺ клеток и интенсивность ИГХ реакции.

Результаты. Группа спонтанных абортов/ПЭ характеризовалась сниженной экспрессией ренина в гигантских клетках трофобласта (ГКТ) и отсутствием ее в эндотелии сосудов плаценты в сравнении с группами физиологической беременности и иммунозависимых абортов. В миометрии и эндотелии его сосудов отмечали повышенную экспрессию ренина в группах спонтанных абортов/ПЭ и иммунозависимых абортов. Экспрессия АПФ2 в ГКТ и гликогеновых клетках, а также эндотелии сосудов плаценты при спонтанных абортах/ПЭ и иммунозависимых абортах была ниже, чем в группе физиологической беременности. Напротив, в миометрии и эндотелии его сосудов наблюдали более высокую экспрессию АПФ2 в группах абортов в сравнении с контролем.

Заключение. Сниженная экспрессия ренина в ГКТ и ее отсутствие в эндотелии сосудов плаценты группы спонтанных абортов/ПЭ отражает нарушение инвазии трофобласта, характерное для ПЭ. Выявленные изменения экспрессии АПФ2 в миометрии при невынашивании беременности и ПЭ, очевидно, несут системный компенсаторный характер, не отменяющий, однако, негативные эффекты ренина.

Ключевые слова: преэклампсия, невынашивание беременности, матка, плацента, ренин-ангиотензин-альдостероновая система

Для корреспонденции: Ксения Александровна Артемьева. E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru

Для цитирования: Артемьева К.А., Степанова И.И., Низяева Н.В., Болтовская М.Н., Богданова И.М., Степанов А.А., Кондашевская М.В., Пономаренко Е.А. Экспрессия ренина и ангиотензинпревращающего фермента 2 в матке и плаценте при иммунозависимых и ассоциированных с преэклампсией спонтанных абортах у мышей. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):53–61. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.4.53-61.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» № 122030200534-4.

Статья поступила 15.11.2022. **Получена после рецензирования** 05.12.2022. **Принята в печать** 10.04.2023.

Renin and angiotensin-converting enzyme 2 expression in the uterus and placenta in immune-dependent and preeclampsia-associated spontaneous abortions in mice

*K.A. Artemyeva, I.I. Stepanova, N.V. Nizyaeva, M.N. Boltovskaya,
I.M. Bogdanova, A.A. Stepanov, M.V. Kondashevskaya, E.A. Ponomarenko*

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

Abstract. *Introduction.* Spontaneous abortion and preeclampsia (PE) are the most common pregnancy abnormalities in humans. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the immune system are among the first to recognize pregnancy and play key roles in its maintenance. RAAS dysfunction is one of the causes of insufficient trophoblast invasion and defect in spiral artery remodeling, which both cause PE. Apart from circulating RAAS components, there are local ones, including uteroplacental ones. The study aimed to analyze the renin and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression in the placenta and uterus in PE-associated spontaneous and immune-dependent abortions in mice.

Materials and methods. We reached the physiological pregnancy model by ♀CBA × ♂Balb/c mating (control group); spontaneous PE-associated abortions were ♀CBA × ♂DBA/2. Induced abortions were caused by intraperitoneal β-heptylglycoside muramyl dipeptide administration to CBA females fertilized by Balb/c males on gestation days (GDs) 5 and 7. Mice were removed from the experiment on GD 14 after the placenta has completely formed. We performed immunohistochemistry (IHC) of the uterus and placenta using rabbit monoclonal antibodies to renin and ACE2 and evaluated the distribution of the renin- and ACE2-positive cells and the intensity of IHC reaction.

Results. Compared to the physiological pregnancy model and immune abortion groups, the spontaneous abortion/PE group was characterized by reduced renin expression in trophoblast giant cells (TGC) and its absence in placental vascular endothelium. We noted increased renin expression in the myometrium and its vascular endothelium in the spontaneous abortion/PE and immune-dependent abortion groups. ACE2 expression in TGC and glycogen cells and placental vascular endothelium was lower in spontaneous/PE and immune-dependent abortions than in the physiological pregnancy group. In contrast, higher ACE2 expression was observed in the myometrium and its vascular endothelium in the abortion groups compared to the controls.

Conclusion. Reduced renin expression in TGC and its absence in the placental vascular endothelium of spontaneous abortions/PE group reflects trophoblast invasion disorder characteristic of PE. The detected changes in ACE2 expression in the myometrium in pregnancy failure and PE may represent a systemic compensatory mechanism, which does not exclude the negative effects of renin.

Keywords: preeclampsia, pregnancy failure, uterus, placenta, renin-angiotensin-aldosterone system

Corresponding author: Ksenia A. Artemyeva. E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru

For citation: Artemyeva K.A., Stepanova I.I., Nizyaeva N.V., Boltovskaya M.N., Bogdanova I.M., Stepanov A.A., Kondashevskaya M.V., Ponomarenko E.A. Renin and angiotensin-converting enzyme 2 expression in the uterus and placenta in immune-dependent and preeclampsia-associated spontaneous abortions in mice. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(4):53–61 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.53-61.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery" No. 122030200534-4.

Received 15.11.2022. **Received in revised form** 05.12.2022. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Самопроизвольный аборт и преэклампсия (ПЭ) являются наиболее частыми акушерскими патологиями. Около 10–15% всех беременностей заканчивается выкидышами в течение первого триместра, что связано преимущественно с нарушениями в иммунной системе матери [1]. Преэклампсия осложняет от 2 до 8% беременностей и служит основной причиной материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [2]. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и система иммунитета одними из первых распознают беременность и играют ключевую роль

в ее поддержании [1, 3]. В маточно-плацентарной единице существует локальная РААС, компоненты которой представлены в цитотрофобласте, децидуальной оболочке и эндотелии сосудов [4]. РААС влияет на трофобластическую инвазию, ангиогенез и плацентарный кровоток [5], ее дисфункция является одной из причин неполноценной инвазии цитотрофобласта и нарушения ремоделирования спиральных артерий. Вместе с измененной сосудистой реактивностью к пептидам ангиотензина (АТ) это способствует развитию гипертонии, повреждению почек и вторичным изменениям нейрогуморального контроля материн-

ского кровообращения и водно-солевого баланса, что ведет в конечном счете к ПЭ [6]. Кроме того, РААС участвует в процессах, связанных с регуляцией клеточной пролиферации, воспалением, окислительным стрессом и ангиогенезом [7, 8]. Плацента человека имеет собственную РААС [4], определяемую с шести недель гестации и наиболее активную на ранних стадиях беременности. Аномальное развитие плаценты связано с чрезмерной секрецией ренина и других белков РААС плацентой и децидуальной оболочкой в материнский кровоток [9]. В дополнение к центральной роли в регуляции артериального давления РААС оказывает разнообразное и комплексное влияние на врожденный и адаптивный иммунитет и может способствовать развитию воспаления и фиброза [10, 11]. Ангиотензинпревращающий фермент 2 (АПФ2) является ключевым модулятором ренин-ангиотензиновой системы, конвертирующим ангиотензин АТ II в АТ (1-7), обладающий сосудорасширяющей активностью. M. Garg et al. продемонстрировали возможную противовоспалительную роль АПФ2 в желудочно-кишечном тракте [12]. Для раскрытия молекулярных механизмов невынашивания беременности мы разработали модель иммунозависимых абортос с высокой частотой эмбриональных потерь (46,7%), обусловленных введением самкам СВА на раннем сроке физиологической беременности β -гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) – иммуномодулятора с четко определенным механизмом действия, а также воспроизвели модель самопроизвольных абортос (34,8% резорбированных эмбрионов) [13], которая рассматривается как модель иммунологически опосредованной ПЭ. У самок СВА/Ж, спаренных с самцами DBA/2, спонтанно развиваются многие признаки ПЭ человека (альбуминурия, эндотелиальная дисфункция, повышенная чувствительность к АТ II и др.), что коррелирует с негативным исходом беременности [14]. Роль маточно-плацентарной РААС и ее взаимодействие с системой иммунитета в патологии беременности изучены недостаточно и требуют дальнейших исследований. Цель работы – анализ экспрессии ренина и ангиотензинпревращающего фермента 2 в плаценте и матке при иммунозависимых и ассоциированных с преэклампсией спонтанных абортос у мышей.

Материалы и методы

В исследовании использовали 25 самок линии СВА, а также самцов линий DBA/2 и Balb/c массой тела 18–20 граммов, полученных из филиала «Столбовая» НЦБТ ФМБА России. Эксперимент проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 и международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Страсбург, 1986). На проведение исследования получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцины, протокол № 35 (11) от 23 марта 2022 года.

Датированную беременность получали, подсаживая самок к самцам в соотношении 3–4:1, день появления копулятивной пробки обозначали как первый день гестации (ДГ). Моделирование физиологической беременности, спонтанных абортос/ПЭ, индуцированных абортос описано ранее [13]. Мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 14-й ДГ по завершении формирования плаценты. Выделяли рога матки, после продольного вскрытия которых забирали плаценты.

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обрабатывали в гистологическом процессоре Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США), заливали в парафин в модульной системе Tissue-Tek TEC (Sakura, США). Срезы толщиной 5–7 мкм готовили на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) и монтировали на стекла с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Menzel/Thermo Fisher Scientific, США). Иммуногистохимическую (ИГХ) реакцию проводили с использованием первичных кроличьих моноклональных антител к ренину (1:100, ab 212197) и АПФ2 (1:100, ab108252) (Abcam, Великобритания) и системы детекции UltraVision LP Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen (TL-015-HD, Thermo Scientific, США). Негативным контролем служили срезы плаценты и стенки матки, инкубированные без первичных антител. По окончании реакции с антителами срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Морфометрическое исследование выполняли на микроскопе Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия) с цифровой фотокамерой. С помощью графического планшета и программы Image Score M (Leica Microsystems, Германия) на всей площади среза (не менее 10 полей зрения) при 200-кратном увеличении оценивали характер распределения ренин⁺ и АПФ2⁺ клеток, а также интенсивность ИГХ реакции в условных единицах.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Применяли метод парных сравнений с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Специфическое окрашивание антителами к АПФ2 было выявлено в ГКТ и гликогенных клетках плаценты, миометрии и эндотелии сосудов миометрии и плаценты. Во всех группах экспрессию ренина обнаруживали в тех же структурах, за исключением гликогенных клеток. Группа спонтанных абортос/ПЭ характеризовалась сниженной экспрессией ренина в ГКТ и отсутствием ее в эндотелии сосудов плаценты в сравнении с группами физиологической беременности и иммунозависимых абортос (табл., рис. 1).

Локализация и интенсивность ИГХ окрашивания компонентов РААС в маточно-плацентарной единице
[усл. ед., Me (Q1; Q3)] | Location and intensity of IHC staining of RAAS components in the uteroplacental unit
[conventional units, Me (Q1; Q3)]

Компоненты РААС RAAS components	Локализация Location	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (1) (n=8)	Спонтанные аборт/ПЭ Spontaneous abortions/PE (2) (n=9)	Индукцированные аборт Induced abortions (3) (n=8)	Значимость различий Significance of differences
АПФ2 ACE2	Гликогеновые клетки Glycogen cells	102 (87; 145)	75,50* (61; 111,88)	51*# (41,5; 69)	$p_{1-2}=0,027$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,025$
	Гигантские клетки трофобласта Trophoblast giant cells	59,25 (55; 64,88)	32* (29,50; 39)	46*# (38; 60)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,003$ $p_{2-3}=0,013$
	Миометрий Myometrium	39,5 (35,38; 44,5)	60* (55,13; 79)	85*# (69; 89)	$p_{1-2}=0,011$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,034$
	Эндотелий сосудов плаценты Endothelium of placental vessels	60,5 (55; 64)	48* (45; 50,75)	40,5* (39; 45)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,077$
	Эндотелий сосудов миометрия Myometrial vascular endothelium	37,5 (36; 41)	45,5* (40; 51,25)	55,5* (47,88; 64,63)	$p_{1-2}=0,027$ $p_{1-3}=0,01$ $p_{2-3}=0,11$
Ренин Renin	Гликогеновые клетки Glycogen cells	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	$p_{1-c}=1,0$ $p_{1-3}=1,0$ $p_{2-3}=1,0$
	Гигантские клетки трофобласта Trophoblast giant cells	39,5 (35; 47)	15,5* (12,95; 18,5)	40,25# (36; 45,5)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,988$ $p_{2-3}<0,001$
	Миометрий Myometrium	27,5 (19,75; 34,5)	84,5* (78; 86,5)	63*# (47,5; 77,5)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$
	Эндотелий сосудов плаценты Endothelium of placental vessels	43 (33,75; 52,25)	0 (0; 0)*	32,25*# (30; 42)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,022$ $p_{2-3}<0,001$
	Эндотелий сосудов миометрия Myometrial vascular endothelium	29,25 (25,5; 32,5)	67* (59,5; 73,25)	71,5* (50,13; 84)	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,003$ $p_{2-3}=0,694$

АПФ2 – Ангиотензинпревращающий фермент 2

* – значимые отличия в сравнении с группой физиологической беременности;

– значимые отличия в сравнении с группой спонтанных абортов/ПЭ

ACE2 – Angiotensin-converting enzyme 2

* – significant differences compared to the physiological pregnancy group;

– significant differences compared to the spontaneous/PE abortion group

В миометрии и эндотелии его сосудов отмечалась повышенная экспрессия ренина как в группе спонтанных абортов/ПЭ, так и в группе иммунозависимых абортов (табл., рис. 2). Экспрессия АПФ2 в ГКТ и гликогеновых клетках, а также эндотелии сосудов плаценты при спонтанных аборт

тах/ПЭ и иммунозависимых абортах была значительно ниже, чем в группе физиологической беременности (табл., рис. 3). Напротив, в миометрии и эндотелии его сосудов отмечалась более высокая экспрессия АПФ2 в группах абортов в сравнении с контролем (табл., рис. 4).

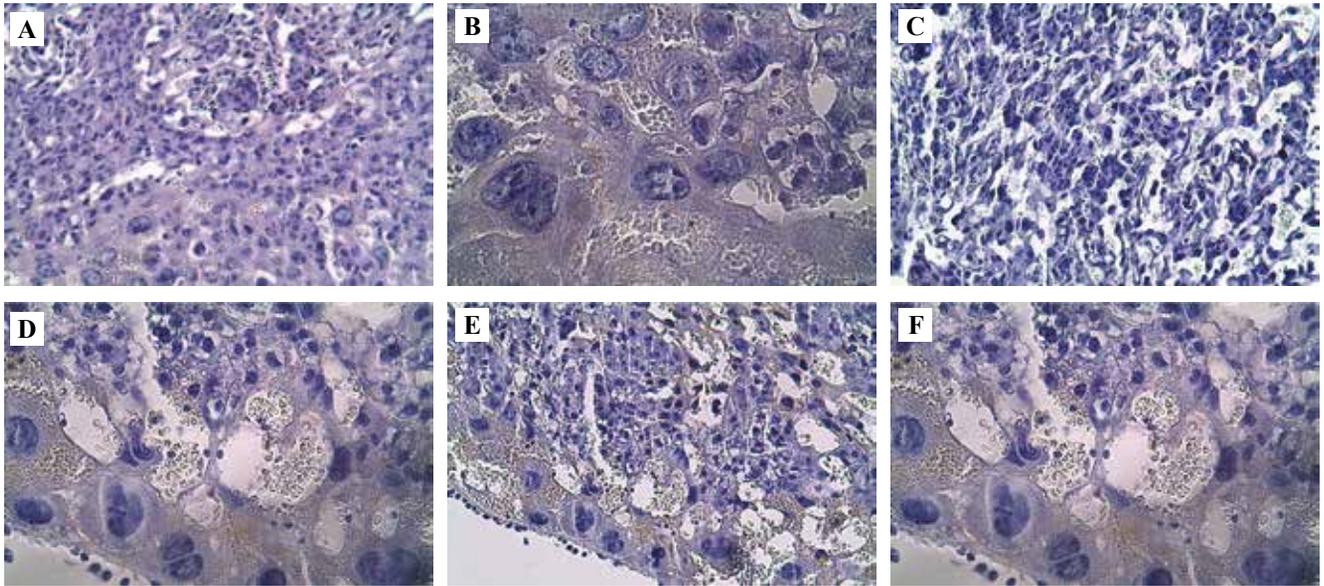


Рис. 1. Экспрессия ренина в плаценте.

А, В – физиологическая беременность, С, D – спонтанные аборты/ПЭ, Е, F – иммунозависимые аборты. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

Fig. 1. Renin expression in the placenta.

А, В – physiological pregnancy, С, D – spontaneous abortions/PE, Е, F – immune-dependent abortions. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

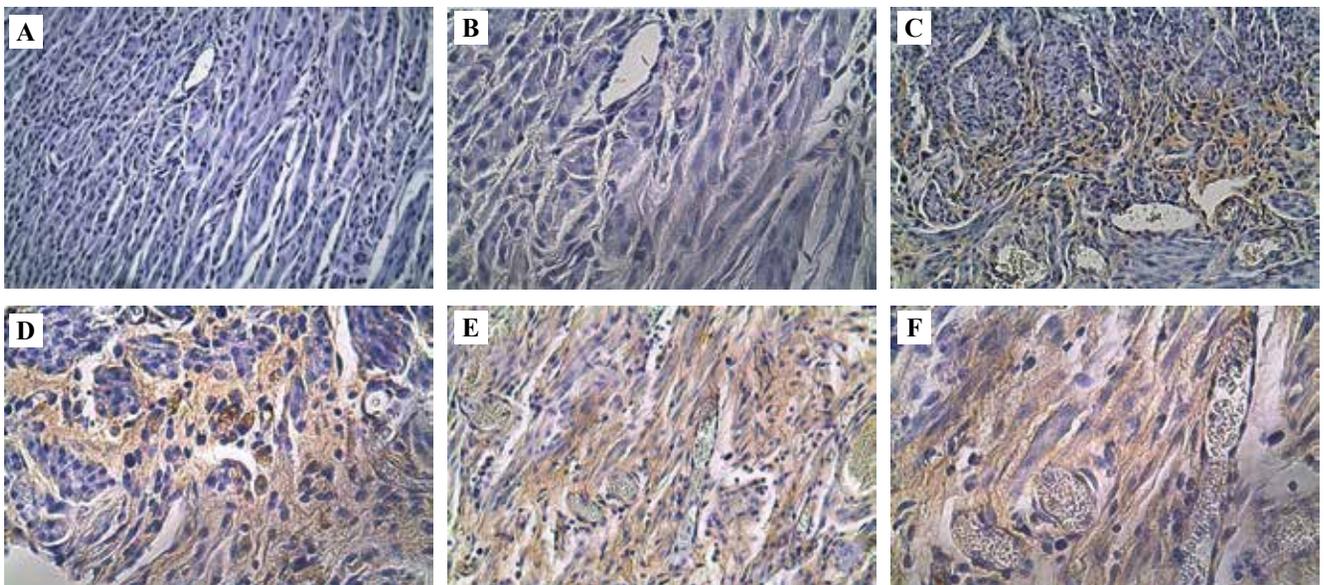


Рис. 2. Экспрессия ренина в миометрии.

А, В – физиологическая беременность, С, D – спонтанные аборты/ПЭ, Е, F – иммунозависимые аборты. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

Fig. 2. Renin expression in the myometrium.

А, В – physiological pregnancy, С, D – spontaneous abortions/PE, Е, F – immune-dependent abortions. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

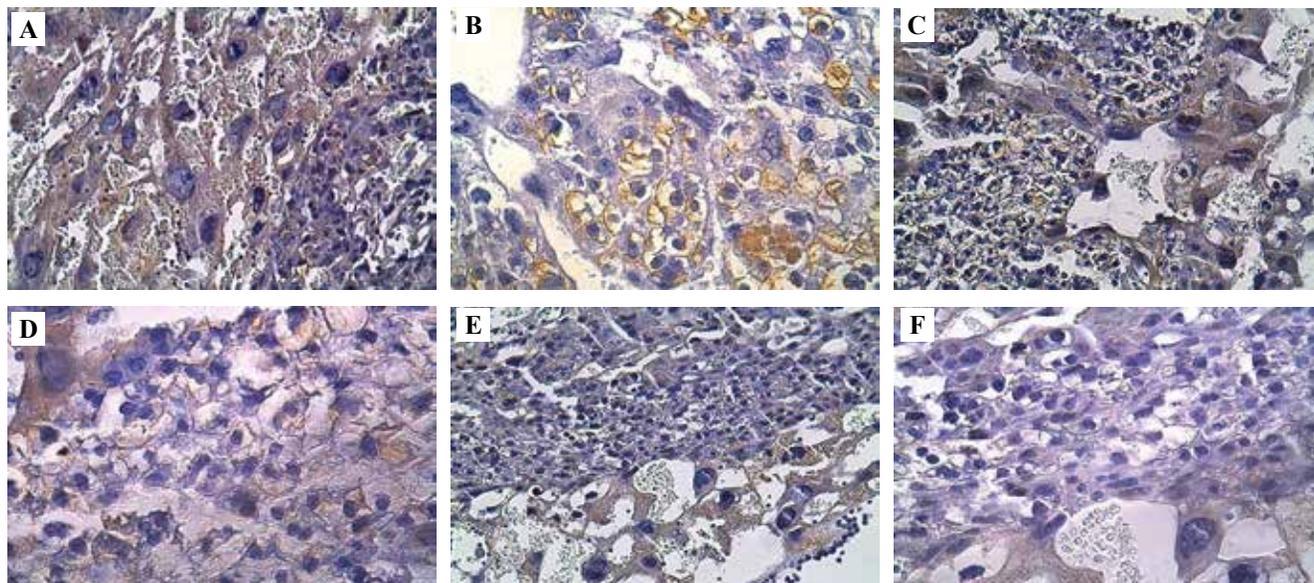


Рис. 3. Экспрессия АПФ2 в плаценте.

А, В – физиологическая беременность, С, D – спонтанные аборты/ПЭ, Е, F – иммунозависимые аборты. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

Fig. 3. ACE2 expression in the placenta.

А, В – physiological pregnancy, С, D – spontaneous abortions/PE, Е, F – immune-dependent abortions. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

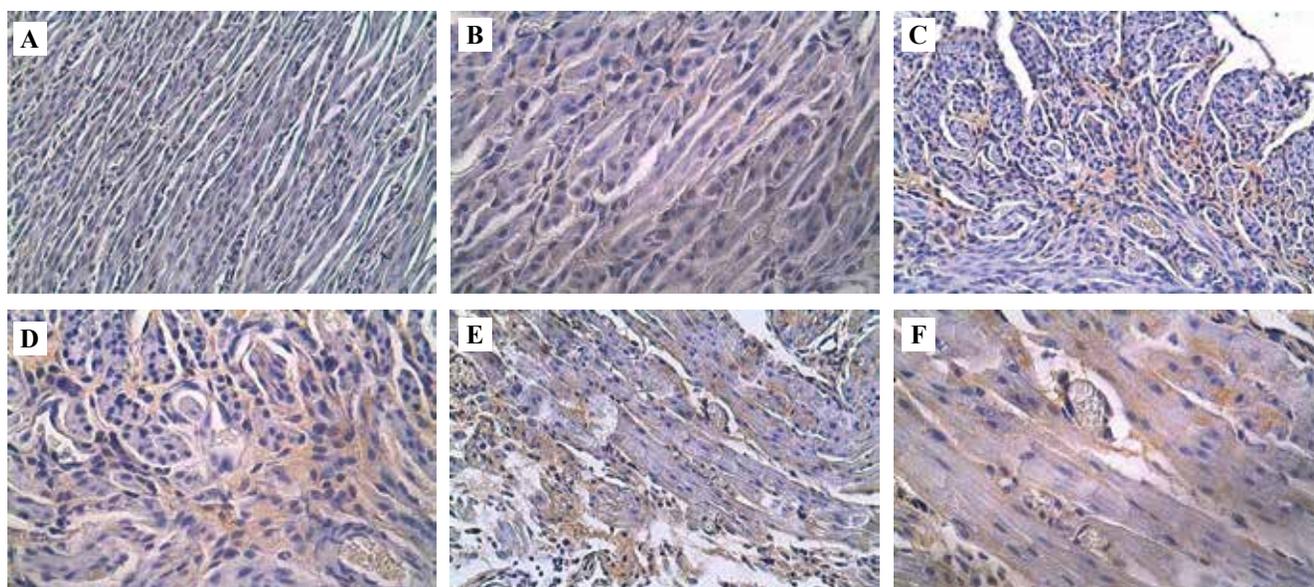


Рис. 4. Экспрессия АПФ2 в миометрии.

А, В – физиологическая беременность, С, D – спонтанные аборты/ПЭ, Е, F – иммунозависимые аборты. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

Fig. 4. ACE2 expression in the myometrium.

А, В – physiological pregnancy, С, D – spontaneous abortions/PE, Е, F – immune-dependent abortions. А, С, Е – $\times 200$, В, D, F – $\times 400$

Обсуждение

В плаценте мышцы гликогеновые клетки спонгиоза трофобласта и ГКТ обладают инвазивным потенциалом, функционально соответствуя вневорсинчатому цитотрофобласту и цитотрофобласту наружных колонн ворсин у человека [15]. Сниженная экспрессия

ренина в ГКТ и ее отсутствие в эндотелии сосудов плаценты группы спонтанных абортов/ПЭ отражает нарушение инвазии трофобласта, характерное для ПЭ. Инвазия клеток трофобласта в спиральные артерии индуцируется, по крайней мере частично, путем активации рецепторов АТ II первого типа (АТ1) [16].

Аномальное развитие плаценты связано с чрезмерной секрецией ренина и других белков РААС/пептидов ангиотензина плацентой и децидуальной оболочкой в материнский кровоток [17]. Локальное усиление экспрессии ренина в матке и плаценте при ПЭ способствует поддержанию высокого артериального давления, как при почечной РААС-опосредованной гипертензии [18]. Таким образом, при ПЭ маточно-плацентарная область является «суррогатной» системой активации РААС, опосредующей участие почек в преэкламптической гипертензии.

Важное место в патогенезе ПЭ занимает чрезмерная воспалительная реакция, приводящая к повреждению эндотелия и усилению экспрессии в мезенхимальных стромальных клетках плаценты провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерферона гамма (ИФН- γ) и др.) [19]. Провоспалительные эффекты РААС, по-видимому, обусловлены взаимодействием АТ II с рецептором АТ1. АТ II активирует несколько путей, связанных с повреждением тканей, воспалением и фиброзом, активацией протеинкиназ и факторов ядерной транскрипции, рекрутированием воспалительных клеток, адгезией моноцитов и нейтрофилов, а также стимуляцией экспрессии, синтеза и высвобождения цитокинов и хемокинов. Ренин является катализатором АТ1 рецепторзависимого воспаления в сосудистой стенке. Стимуляция рецептора (про)ренина повышает провоспалительный уровень цитокинов в сосудистой системе и микроглии [20].

РААС обладает как провоспалительным, так и противовоспалительным действием. В экспериментальных моделях у животных с дефицитом АПФ2 отмечают более высокие уровни экспрессии ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α и накопление нейтрофилов. Ось АПФ2/АТ (1-7)/MAS подавляет воспаление, ингибируя миграцию лейкоцитов, высвобождение и экспрессию цитокинов и профибротические механизмы [21]. Показано, что сверхэкспрессия АПФ2 в паравентрикулярном ядре ослабляет АТ II индуцированное увеличение экспрессии ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 [22]. Иммуные эффекты фермента АПФ2 могут возникать в результате преобразования АТ II в АТ (1-7). Введение АТ (1-7) или сверхэкспрессия АПФ2 ингибируют накопление нейтрофилов и адгезию лейкоцитов, провоспалительные цитокины ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α и усиливают экспрессию противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [23]. Снижая уровень АТ II в почках и сосудистой системе, АПФ2 уменьшает воспалительные реакции, вызванные гемодинамическим повреждением, опосредованным АТ II [20]. Очевидно, выявленные нами изменения экспрессии АПФ2 в миометрии при невынашивании беременности и ПЭ носят системный компенсаторный характер, не отменяющий, в свою очередь, негативные эффекты ренина.

РААС участвует также в регуляции роста. Дефицит АПФ2 и обусловленное им повышение уровня пла-

центарного АТ II негативно влияют на гестационное увеличение массы плода [24]. Показана связь между снижением экспрессии АПФ2 в моноцитах крови и задержкой роста у детей, а также меньший, чем в группе контроля, вес у АПФ2 нокаутированных мышей [25]. Ранее мы установили, что площадь среза маточно-плацентарной единицы была наименьшей в группе иммунозависимых абортосмышей, что соответствует минимальной экспрессии АПФ2 в гликогеновых клетках плаценты этой группы [13].

Заключение

В работе мы впервые оценили экспрессию компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в миометрии и плаценте мышей со спонтанными, ассоциированными с преэклампсией, и иммунозависимыми абортами. Группа спонтанных абортов/преэклампсии характеризовалась сниженной экспрессией ренина в гигантских клетках трофобласта и отсутствием ее в эндотелии сосудов плаценты в сравнении с группами физиологической беременности и иммунозависимых абортов. В миометрии и эндотелии его сосудов отмечали повышенную экспрессию ренина в обеих группах невынашивания. В группах абортов отмечали сниженную экспрессию ангиотензинпревращающего фермента 2 в плаценте и повышенную в миометрии в сравнении с контролем. Несмотря на то, что регуляция воспаления во время беременности хорошо исследована, участие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, в частности защитную роль ангиотензинпревращающего фермента 2, в поддержании баланса между провоспалительными и противовоспалительными механизмами еще предстоит изучить. Дальнейшие исследования ренин-ангиотензин-альдостероновой системы могут быть использованы для разработки новых подходов к предотвращению и лечению осложнений беременности.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.А. Артемьева, Н.В. Низяева, М.Н. Болтовская.
Сбор и обработка материала – К.А. Артемьева, И.И. Степанова, И.М. Богданова, А.А. Степанов, Е.А. Пономаренко.
Написание текста – К.А. Артемьева.
Редактирование – Н.В. Низяева, М.Н. Болтовская, М.В. Кондашевская.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – K.A. Artemyeva, N.V. Nizyaeva, M.N. Boltovskaya.
Collected the data and performed the analysis – K.A. Artemyeva, I.I. Stepanova, I.M. Bogdanova, A.A. Stepanov, E.A. Ponomarenko.
Wrote the paper – K.A. Artemyeva.
Edited the manuscript – N.V. Nizyaeva, M.N. Boltovskaya, M.V. Kondashevskaya.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Eikmans M, Morales-Prieto DM, van der Hoorn ML, Markert UR.* Editorial: immunological challenges around pregnancy complications associated with failures of maternal tolerance to the fetus. *Front Immunol.* 2022;13:983739. DOI: 10.3389/fimmu.2022.983739.
2. *Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H et al.* The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: a pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019;145 Suppl 1(Suppl 1):1–33. DOI: 10.1002/ijgo.12802.
3. *Leal CRV, Costa LB, Ferreira GC, Ferreira AM, Reis FM, Simões E Silva AC.* Renin-angiotensin system in normal pregnancy and in preeclampsia: a comprehensive review. *Pregnancy Hypertens.* 2022;28:15–20. DOI: 10.1016/j.preghy.2022.01.011.
4. *Yart L, Roset Bahmanyar E, Cohen M, Martinez de Tejada B.* Role of the uteroplacental renin-angiotensin system in placental development and function, and its implication in the preeclampsia pathogenesis. *Biomedicines.* 2021;9(10):1332. DOI: 10.3390/biomedicines9101332.
5. *Gathiram P, Moodley J.* The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: a review. *Curr Hypertens Rep.* 2020;22(11):89. DOI: 10.1007/s11906-020-01098-2.
6. *Yang J, Shang J, Zhang S, Li H, Liu H.* The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: genetic polymorphisms and microRNA. *J Mol Endocrinol.* 2013;50(2):R53–66. DOI: 10.1530/JME-12-0216.
7. *Mishra JS, Chen DB, Kumar S.* AT2R activation increases in vitro angiogenesis in pregnant human uterine artery endothelial cells. *PLoS One.* 2022;17(4):e0267826. DOI: 10.1371/journal.pone.0267826.
8. *Farag E, Maheshwari K, Morgan J, Sakr Esa WA, Doyle DJ.* An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesth Analg.* 2015;120(2):275–92. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000528.
9. *Arthurs AL, Lumbers ER, Delforce SJ, Mathe A, Morris BJ, Pringle KG.* The role of oxygen in regulating microRNAs in control of the placental renin-angiotensin system. *Mol Hum Reprod.* 2019;25(4):206–17. DOI: 10.1093/molehr/gaz004.
10. *Rudemiller NP, Crowley SD.* Interactions between the immune and the renin-angiotensin systems in hypertension. *Hypertension.* 2016;68(2):289–96. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06591.
11. *Cantero-Navarro E, Fernández-Fernández B, Ramos AM, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Sánchez-Niño MD et al.* Renin-angiotensin system and inflammation update. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;529:111254. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111254.
12. *Garg M, Christensen B, Lubel JS.* Gastrointestinal ACE2, COVID-19 and IBD: opportunity in the face of tragedy? *Gastroenterology.* 2020;159(4):1623–4.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.04.051.
13. *Артемяева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Степанов А.А., Пономаренко Е.А. и др.* Особенности морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона мыши на ранних сроках экспериментального невынашивания беременности. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2020;9(3):50–60. DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.50-60.
14. *Artemyeva KA, Bogdanova IM, Stepanova II, Boltovskaya MN, Stepanov AA, Ponomarenko EA et al.* Morphofunctional features of the uteroplacental unit and mouse embryo in the early stages of experimental miscarriage. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(3):50–60 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.50-60.
15. *McKelvey KJ, Yenson VM, Ashton AW, Morris JM, McCracken SA.* Embryonic/fetal mortality and intrauterine growth restriction is not exclusive to the CBA/J sub-strain in the CBA × DBA model. *Sci Rep.* 2016;6:35138. DOI: 10.1038/srep35138.
16. *Rusidzé M, Gargaros A, Fébrissy C, Dubucs C, Weyl A, Ousselin J et al.* Estrogen actions in placental vascular morphogenesis and spiral artery remodeling: a comparative view between humans and mice. *Cells.* 2023;12(4):620. DOI: 10.3390/cells12040620.
17. *Campbell N, LaMarca B, Cunningham MW Jr.* The role of agonistic autoantibodies to the angiotensin II type 1 receptor (AT1-AA) in pathophysiology of preeclampsia. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(10):781–5. DOI: 10.2174/1389201019666180925121254.
18. *Lumbers ER, Delforce SJ, Arthurs AL, Pringle KG.* Causes and consequences of the dysregulated maternal renin-angiotensin system in preeclampsia. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:563. DOI: 10.3389/fendo.2019.00563.
19. *Martell Claros N, Asenjo de la Fuente JE, Abad Cardiel M, García Donaire JA, Herráiz MA.* Papel del sistema renina-angiotensina en el embarazo y la preeclampsia (Role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia). *Hipertens Riesgo Vasc.* 2020;37(2):72–7 (In Span.). DOI: 10.1016/j.hipert.2020.02.003.
20. *Todros T, Masturzo B, De Francia S.* COVID-19 infection: ACE2, pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;253:330. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.08.007.
21. *Crowley SD, Rudemiller NP.* Immunologic effects of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1350–61. DOI: 10.1681/ASN.2016101066.
22. *Morganstein T, Haidar Z, Trivlidis J, Azuelos I, Huang MJ, Eidelman DH et al.* Involvement of the ACE2/Ang-(1-7)/MasR axis in pulmonary fibrosis: implications for COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12955. DOI: 10.3390/ijms222312955.
23. *Ong WY, Satish RL, Herr DR.* ACE2, circumventricular organs and the hypothalamus, and COVID-19. *Neuromolecular Med.* 2022;24(4):363–73. DOI: 10.1007/s12017-022-08706-1.
24. *Tamanna S, Lumbers ER, Morosin SK, Delforce SJ, Pringle KG.* ACE2: A key modulator of the renin-angiotensin system and pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2021;321(6):R833–43. DOI: 10.1152/ajpregu.00211.2021.
25. *Delforce SJ, Lumbers ER, Ellery SJ, Murthi P, Pringle KG.* Dysregulation of the placental renin-angiotensin system in human fetal growth restriction. *Reproduction.* 2019;158(3):237–45. DOI: 10.1530/REP-18-0633.
26. *Tonon F, Tornese G, Giudici F, Nicolardi F, Toffoli B, Barbi E et al.* Children with short stature display reduced ACE2 expression in peripheral blood mononuclear cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:912064. DOI: 10.3389/fendo.2022.912064.

Информация об авторах

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ирина Ильдаровна Степанова – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Наталья Викторовна Низяева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Марина Николаевна Болтовская – доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ирина Марковна Богданова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александр Алексеевич Степанов – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Марина Владиславовна Кондашевская – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

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

Irina I. Stepanova – Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<http://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Natalya V. Nizyaeva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-5592-5690>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<http://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Irina M. Bogdanova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<http://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Alexander A. Stepanov – Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>

Marina V. Kondashevskaya – Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Cell Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0002-8096-5974>

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Inflammation Immunomorphology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

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

Морфологическое исследование процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крысы после механического повреждения

Е.С. Петрова, Е.А. Колос

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Травма периферических нервных проводников является важной социально значимой проблемой. Для разработки новых способов стимуляции регенерации поврежденных нервов необходимы углубленные фундаментальные исследования молекулярно-клеточных механизмов, регулирующих дегенеративные и репаративные процессы, возникающие в нервном стволе в ответ на повреждение. Цель настоящей работы – используя иммуногистохимические и гистохимические методы исследования, изучить структурные изменения, происходящие в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы.

Материалы и методы. Седалищный нерв крысы повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 секунд. Через 7, 21, 60 суток изучали изменения нервных волокон с помощью иммуногистохимической (ИГХ) реакции на альфа-тубулин и окраски на миелин люксолевым прочным синим. Для исследования клеток периневрия применяли антитела к белку плотных контактов клаудину-1. Шванновские клетки (нейролеммоциты) идентифицировали проведением ИГХ реакции на GFAP, макрофаги — на белок Iba-1.

Результаты. Показано, что через 7 суток после наложения лигатуры в эндоневрии дистального сегмента седалищного нерва крысы происходят дегенерация большинства нервных волокон, распад миелиновых оболочек, нарушение гематоневрального барьера, миграция гематогенных макрофагов и дедифференцировка шванновских клеток. Через 21 сутки наблюдаются рост нервных волокон из проксимального сегмента нерва и их ремиелинизация. Через 60 суток их количество достигает наибольшей величины по сравнению с показателями предыдущих сроков.

Заключение. Впервые на модели повреждения нерва путем наложения лигатуры (40 секунд) проведена оценка процессов валлеровской дегенерации, используя гистохимические и иммуногистохимические методы. Установлена зависимость между степенью распада миелина и количеством Iba-1⁺ макрофагов. В дистальном сегменте нерва отмечено нарушение состояния периневрия, выявлены дедифференцированные митотически делящиеся шванновские клетки.

Ключевые слова: валлеровская дегенерация, поврежденный нерв крысы, люксолевый прочный синий, клаудин-1, белок Iba-1, GFAP, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Елена Сергеевна Петрова. E-mail: iempes@yandex.ru

Для цитирования: Петрова Е.С., Колос Е.А. Морфологическое исследование процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крысы после механического повреждения. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):62–70. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.62-70.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины (№ FGWG-2022-0002).

Статья поступила 07.12.2022. Получена после рецензирования 22.12.2022. Принята в печать 10.04.2023.

Morphological analysis of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve following mechanical damage

E.S. Petrova, E.A. Kolos

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Introduction. Peripheral nerve injury is an important social problem. Fundamental research on mechanisms regulating degenerative and reparative processes that occur in the nerve following injury is necessary to find new ways of improving nerve regeneration. The purpose was to study the structural changes in the distal segment of the rat sciatic nerve at early stages following injury (ligature) using immunohistochemical and histochemical methods.

Materials and methods. The rat sciatic nerve was subjected to mechanical trauma through ligation for a duration of 40 seconds. After days 7, 21, and 60, we analyzed changes in the nerve fibers using immunohistochemical reactions for alpha-tubulin and Luxol Fast Blue stains for myelin. Antibodies to tight junction protein claudin-1 were used to study perineurial cells. We identified Schwann cells (neurolemmocytes) and macrophages with the reaction for GFAP and the Iba-1 protein IHC reaction, respectively.

Results. After 7 days, we observed degeneration of most nerve fibers, disintegration of myelin sheaths, disruption of the blood-neural barrier, migration of hematogenous macrophages, and dedifferentiation of Schwann cells in the endoneurium of the rat sciatic nerve distal segment. However, after day 21, the growth of nerve fibers from the proximal segment of the nerve and their remyelination were observed. The density of nerve fibers reached its highest value 60 days after the injury.

Conclusion. We evaluated the relationship between the degree of myelin breakdown and the number of Iba-1⁺ macrophages, detected changes in the perineurium in the distal segment of the nerve, and identified dedifferentiated mitotically dividing Schwann cells.

Keywords: Wallerian degeneration, damaged rat nerve, Luxol Fast Blue, claudin-1, Iba-1 protein, GFAP, immunohistochemistry

Corresponding author: Elena S. Petrova. E-mail: iempes@yandex.ru

For citation: Petrova E.S., Kolos E.A. Morphological analysis of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve following mechanical damage. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(4):62–70 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.62-70.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Institute of Experimental Medicine (No. FGWG-2022-0002).

Received 07.12.2022. **Received in revised form** 22.12.2022. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Травма периферических нервных проводников является важной социально значимой проблемой [1–3]. В зависимости от степени повреждения нервов в результате переломов, ушибов, сдавления при разрастании близлежащей опухоли потенциал восстановления нервных волокон различен. Нередко повреждение нерва приводит к инвалидизации, в связи с чем особенно актуален поиск способов стимуляции регенерации нервных проводников.

Совершенствование методов улучшения восстановления нервных проводников проводится в течение многих десятилетий. В настоящее время такие экспериментальные разработки ведутся в нескольких направлениях: применяется электростимуляция [4], создаются специальные футляры (кондуиты), соединяющие проксимальный и дистальный концы поврежденных нервных стволов [5–7], совершенствуются хирургические методы [8], разрабатываются способы клеточной [9–12] и генной [13, 14] терапии. Для развития перечисленных методов необходимы глубокие фундаментальные знания механизмов дегенеративных и репаративных процессов, происходящих в нервных проводниках после травмы. Еще в начале прошлого века английский исследователь А. Валлер описал изменения, происходящие в дистальном сегменте поврежденного нерва, и эти изменения в дальнейшем получили название «валлеровская дегенерация» (ВД). Они включают в себя дегенерацию нервных волокон, их демиелинизацию, дедифференцировку шванновских клеток (ШК) и другие процессы [3, 15]. Из проксимального сегмента нервного ствола на периферию (после

разветвления) начинается рост вновь образовавшихся нервных волокон, подвергающихся впоследствии ремиелинизации. Малоизученными остаются вопросы клеточных коммуникаций в дистальном сегменте поврежденного нерва в процессе де- и регенерации [15].

Цель настоящей работы – используя иммуногистохимические и гистохимические методы исследования, изучить структурные изменения, происходящие в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар-Киото массой 200–250 граммов (n=30) с соблюдением правил Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986) и одобрена локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

Седалищный нерв крыс повреждали путем наложения лигатуры (40 секунд). В разные сроки после операции сегменты нерва в области повреждения выделяли и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. После соответствующей гистологической обработки материал заливали в парафин. Для изучения нервных структур применяли мышинные моноклональные антитела к альфа-тубулину (клон DM-1A, BioGenex, США). В качестве вторичных реагентов для выявления мышинных антител использовали набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Для идентификации клеток периневральной оболочки применяли

поликлональные кроличьи антитела к клаудину-1 (Cldn-1) (Spring Bioscience, США), для нейролеммоцитов – поликлональные кроличьи антитела к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) (Agilent, США). Для детекции первичных кроличьих антител в качестве вторичных реагентов пользовались набором Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (Spring Bioscience, США). Для идентификации макрофагов использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (Abcam, Великобритания) [16]. Флуоресцентное выявление GFAP осуществляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с TRITC (Dako, Дания). Для идентификации ядер клеток использовали ядерный краситель DAPI (Invitrogen, США). Для изучения состояния миелиновых волокон препараты окрашивали люксоловым прочным синим (Luxol Fast Blue, LFB), позволяющим проводить количественную оценку клиренса миелина. Анализ полученных препаратов осуществляли с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica Microsystems, Германия), а также флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 и фотокамеры Leica DFC420 (Leica Microsystems, Германия). Измерение площади, занятой окрашенными специфическими маркерами структурами, осуществляли, используя программу ImageJ (NIH, США). Положительное окрашивание миелина выражали в процентах от общей исследованной площади. Измерения проводили на изображениях площадью 82365,2 мкм² (от 4 до 5 изображений на животное) ($\times 400$). Оценку плотности распределения макрофагов проводили при $\times 100$. Количественные данные приведены как среднее значение в группе со стандартной ошибкой.

В связи с тем, что распределение в группах отличается от нормального, при проведении статистического анализа применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим сравнением групп с помощью критерия Данна. Значимыми считали различия групп при $p < 0,05$. При оценке первого параметра (миелиновые волокна) – $p = 0,0009$; второго параметра (осевые цилиндры) – $p = 0,0025$; третьего параметра (макрофаги) – $p = 0,0142$.

Результаты

Состояния миелиновых оболочек в нерве крысы изучали с помощью их окрашивания LFB. Гистологический анализ продольных срезов седалищного нерва показал, что в нервных стволах intactных крыс большинство нервных волокон является миелиновыми и окрашивается LFB в бирюзовый цвет. На препаратах видно, что распределение липопротеинов в миелиновом волокне неодинаково и образует своеобразную сеточку. Установлено, что в разные сроки после повреждения миелиновые волокна выглядят по-разному. Через 7 суток после наложения лигатуры в проксимальном сегменте нерва плотность распределения миелиновых волокон не отличается от таковой в intactном нерве

(рис. 1, 2 А). Нервные волокна дистального сегмента подвергаются ВД (рис. 2 В). LFB-позитивными являются небольшие фрагменты распавшихся миелиновых волокон. В течение последующих двух недель в дистальном сегменте осуществляется процесс ремиелинизации вновь регенерировавших аксонов, растущих на периферию из проксимального конца. Через 21 сутки процент миелинизации значительно возрастает относительно такового на предыдущем сроке (рис. 2, табл.). По сравнению с миелиновыми волокнами проксимального сегмента эти волокна располагаются более разреженно, и процент миелинизации не достигает процента миелинизации проксимального сегмента. Через 60 суток процент миелинизации возрастает, но по-прежнему сохраняется меньшим, чем в intactном нерве (табл.).

Одним из основных процессов ВД является деградация нервных волокон в дистальном сегменте нерва. При применении иммуногистохимической (ИГХ) реакции на альфа-тубулин (αT) было установлено, что в intactном нерве крысы выявляются осевые цилиндры волокон разного диаметра: от 0,7 мкм до 7–8 мкм (рис. 3). Через 7 суток после наложения лигатуры в дистальном конце встречаются отдельные тонкие волокна. Спустя 21 сутки и 60 суток их число и диаметр увеличиваются, но остаются меньше показателей intactного нерва (табл.).

Наряду с демиелинизацией и разрушением аксонов в ранние сроки после травмы в поврежденном нерве наблюдается изменение состояния периневральной оболочки. Клетки периневрия, непосредственно прилежащие к эндоневрию, участвуют в формировании гематоневрального барьера. С помощью ИГХ маркера клеток периневрия, белка плотных контактов Cldn-1,

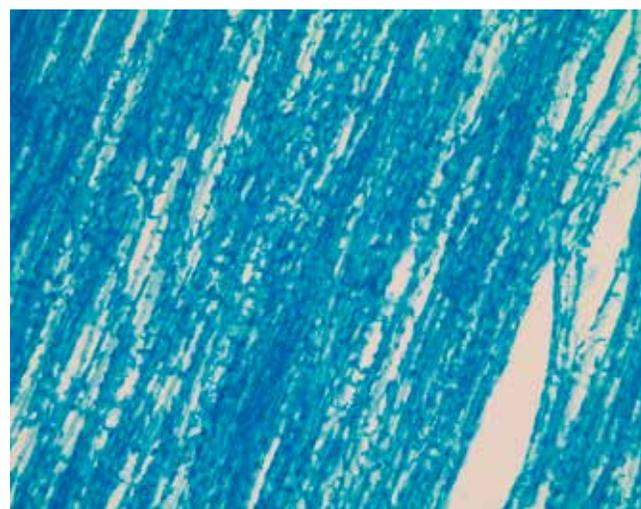


Рис. 1. Миелиновые нервные волокна в седалищном нерве intactной крысы. Окраска люксоловым прочным синим, $\times 400$

Fig. 1. Myelinated nerve fibers in the sciatic nerve of an intact rat. Luxol Fast Blue staining, $\times 400$

Изменение процессов валлеровской дегенерации в дистальном сегменте поврежденного нерва крысы |
Changes in the processes of Wallerian degeneration in the distal segment of the damaged rat nerve

Параметры Parameters	Интактный нерв Intact nerve	Время после наложения лигатуры (суток) Time following the ligation (days)		
		7	21	60
Миелиновые нервные волокна (площадь LFB ⁺ структур, %) Myelinated nerve fibers (area of LFB ⁺ structures, %)	67,3±5,6	16,3±1,5*	43,3±2,4**	35,8±4,1*
Осевые цилиндры нервных волокон (площадь αT ⁺ структур, %) Axial cylinders nerve fibers (area αT ⁺ structures, %)	12,9±0,7	1,4±0,1*	8,2±1,5**	9,1±0,8*
Макрофаги (площадь Iba-1 ⁺ структур, %) Macrophages (area of Iba-1 ⁺ structures, %)	1,4±0,3	4,9±0,4*	1,4±0,2**	1,2±0,1

* p<0,05 (сравнение с интактным нервом | compared to intact nerve)

** p<0,05 (сравнение с предыдущим сроком | compared to previous time period)

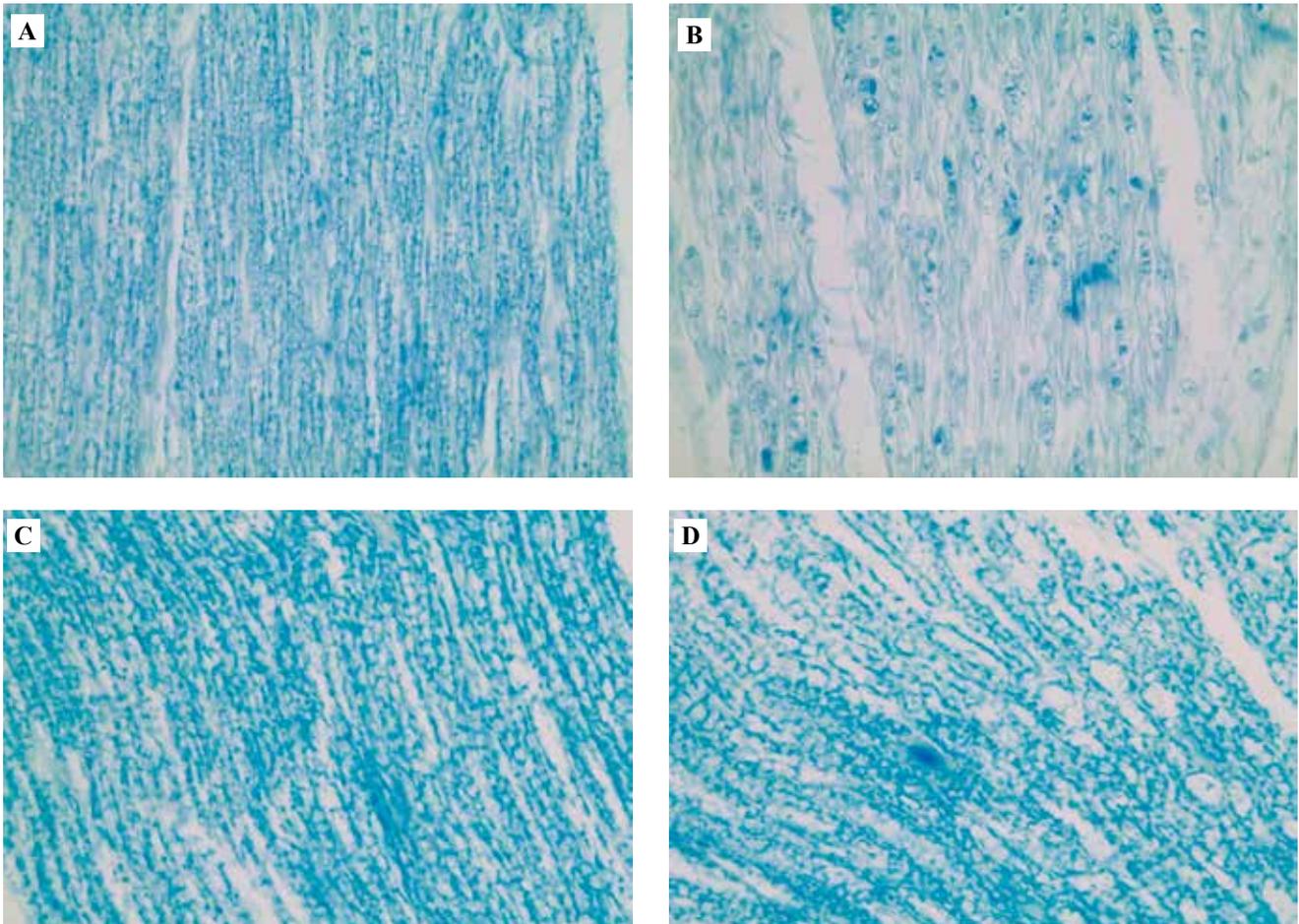


Рис. 2. Изменение плотности распределения миелиновых нервных волокон в седалищном нерве крысы в разные сроки после наложения лигатуры.

A, C – проксимальный сегмент нерва, B, D – дистальный сегмент нерва. A, B – через 7 суток после травмы, C, D – через 21 сутки после травмы. Окраска люксоловым прочным синим, ×400

Fig. 2. Changes in the density of myelinated nerve fibers in the rat sciatic nerve at different time periods following the ligation. A, C – proximal segment of the nerve, B, D – distal segment of the nerve. A, B – 7 days after the injury, C, D – 21 days after the injury. Luxol Fast Blue staining, ×400

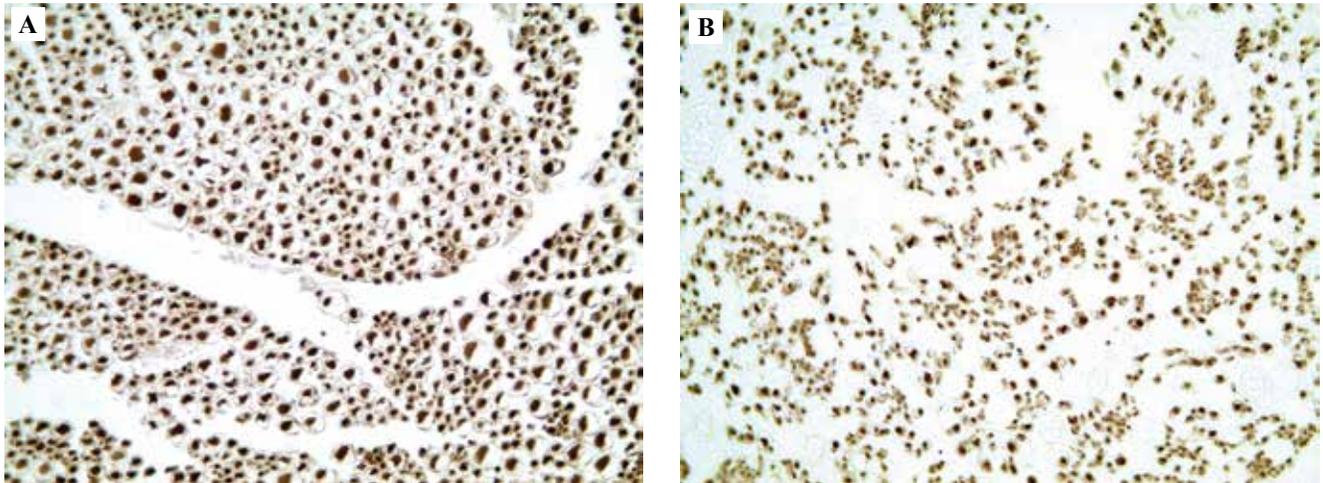


Рис. 3. Изменение плотности распределения нервных волокон после повреждения седалищного нерва путем наложения лигатуры.

А – поперечный срез через intactный нерв, В – поперечный срез через дистальный сегмент поврежденного нерва через 21 сутки после травмы. ИГХ реакция на альфа-тубулин, $\times 400$

Fig. 3. Change in the density of nerve fibers after the ligature-induced injury in the sciatic nerve.

А – transverse section through the intact nerve, В – transverse section through the distal segment of the nerve 21 days after the injury. IHC assay to alpha-tubulin, $\times 400$

нами было показано, что в intactном нерве в области границы периневрия с эндоневрием Cldn-1⁺ структуры располагаются на всем протяжении исследуемого фрагмента нерва непрерывно. После наложения лигатуры наблюдается разреженность плотного слоя клеток периневрия, и Cldn-1⁺ структуры фрагментарны (рис. 4).

Один из наиболее важных процессов, сопровождающих ВД, – миграция макрофагов, которые участвуют в утилизации продуктов распада миелина. Следствием нарушения гематоневрального барьера является миграция гематогенных макрофагов в эндоневрий поврежденного нервного ствола. Используя макрофагальный маркер, кальцийсвязывающий белок Iba-1, установлено, что через 7 суток после наложения лигатуры в дистальном сегменте нерва значительно

увеличивается количество макрофагов (рис. 5, табл.). Показано, что через 21 сутки плотность распределения макрофагов в эндоневрии заметно снижается. Через 60 суток отдельные клетки выявляются в эндоневрии и эпиневррии дистального сегмента поврежденного нерва, макрофаги эндоневрия при этом не содержат продуктов распада миелина.

Исследование нейролеммоцитов в дистальном сегменте поврежденного нерва с помощью ИГХ реакции на GFAP показало, что GFAP-содержащие нейролеммоциты, практически отсутствующие в intactном нерве, появляются в значительном количестве через 7 суток после повреждения (рис. 6). Установлено, что часть из них митотически делится (рис. 6 С). В более поздние сроки наблюдения число GFAP⁺ клеток снижается.

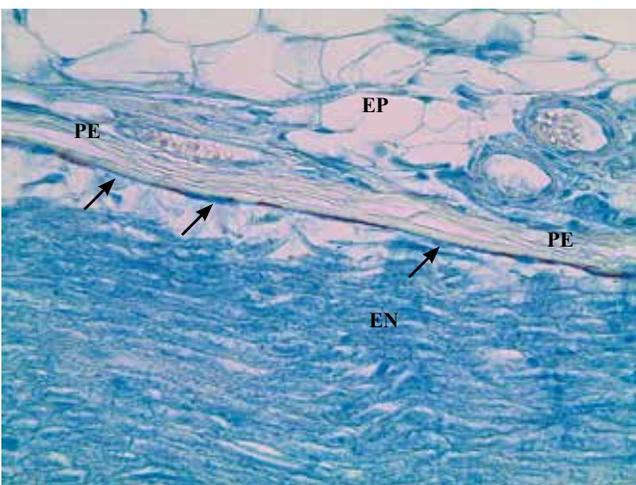


Рис. 4. Нарушение гематоневрального барьера в нерве крысы через 21 сутки после повреждения.

Стрелки – фрагменты периневрия, лишенные плотных контактов. EN – эндоневрий, EP – эпиневррий, PE – периневрий. ИГХ реакция на клаудин-1, подкрашивание астровым синим, $\times 400$

Fig. 4. Changes in the blood-nerve barrier of the rat nerve 21 days after the injury.

Arrows – perineurium fragments without tight contacts. EN – endoneurium, EP – epineurium, PE – perineurium. IHC assay to claudin-1, aster blue staining, $\times 400$

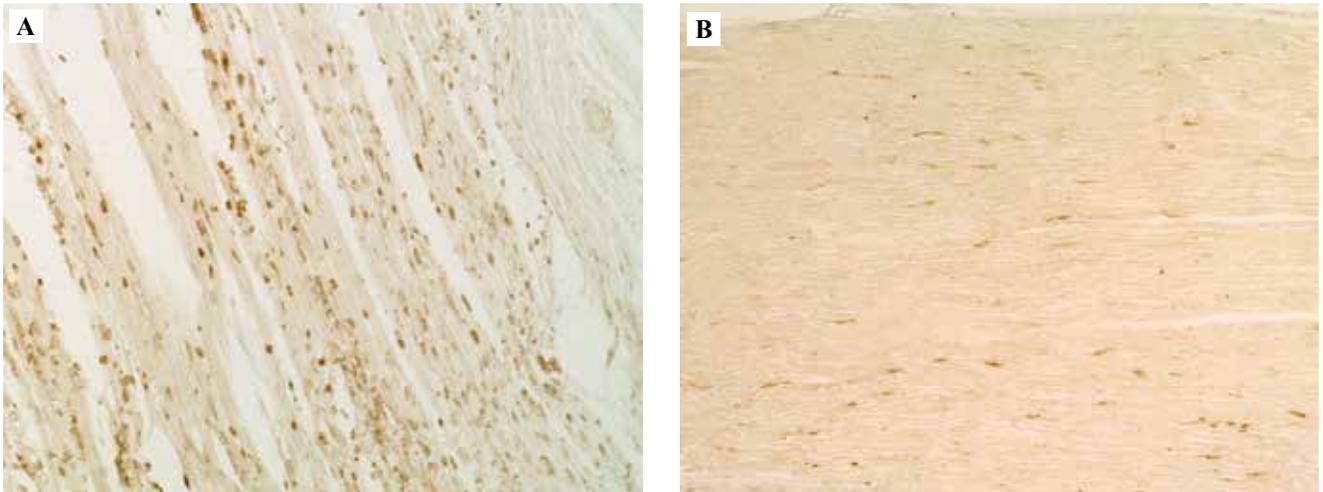


Рис. 5. Макрофаги в дистальном сегменте нерва через 7 суток (А) и 21 сутки (В) после повреждения. ИГХ реакция на белок Iba-1, $\times 100$

Fig. 5. Macrophages in the distal nerve segment 7 days (A) and 21 days (B) after the injury. IHC assay to the Iba-1 protein, $\times 100$

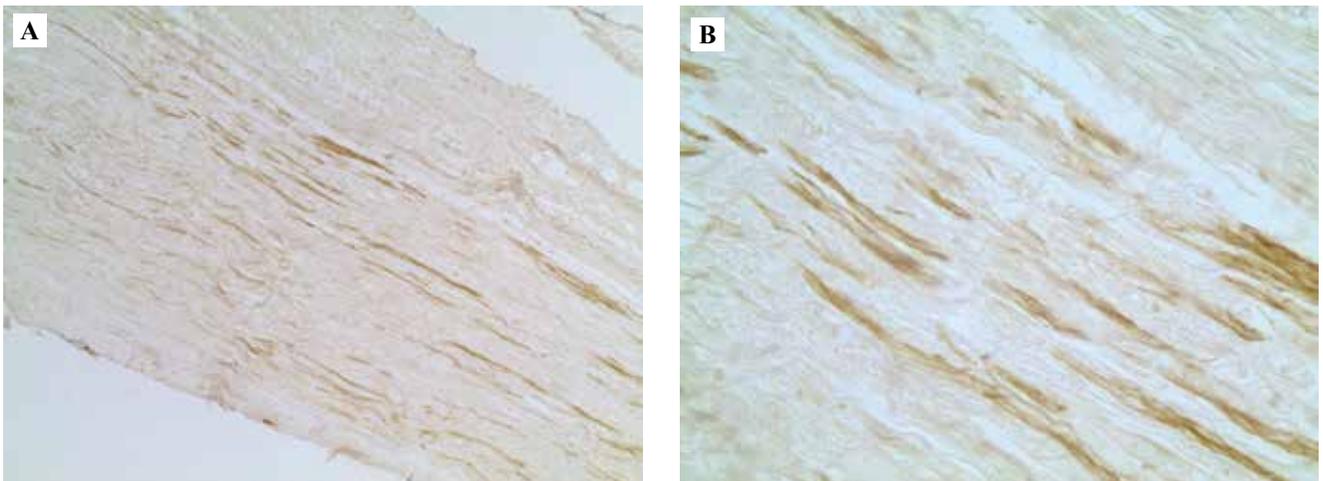


Рис. 6. Нейролеммоциты в дистальном сегменте поврежденного нерва крысы через 7 суток после операции.

А – общий вид дистального сегмента нерва, продольный срез, В – фрагмент эндоневрия с нейролеммоцитами, С – митотически делящиеся нейролеммоциты. Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный), подкрашивание ядер DAPI (синий), $\times 100$ (А), $\times 400$ (В), $\times 600$ (С)

Fig. 6. Neurolemmocytes in the distal segment of the injured rat nerve 7 days after the surgery.

А – general view of the distal segment of the nerve, longitudinal section, В – fragment of endoneurium with neurolemmocytes, С – mitotically dividing neurolemmocytes. Immunohistochemical reaction to GFAP. Visualization with TRITC fluorochrome (red), staining of nuclei with DAPI (blue), $\times 100$ (A), $\times 400$ (B), $\times 600$ (C)

Обсуждение

В настоящей работе изучены процессы ВД, происходящие в дистальном сегменте передавленного нерва, с применением современных морфологиче-

ских методов. Исследовано следующее: 1) процесс демиелинизации нервных волокон в дистальном конце нерва после наложения лигатуры; 2) регенерация нервных волокон; 3) изменение в периневраль-

ной оболочке; 4) дедифференцировка шванновских клеток.

Для выявления миелиновых оболочек ранее применяли методы их осмирования, в настоящее время проводят ИГХ реакции на основной белок миелина и ряд других маркеров. Мы использовали гистохимический краситель LFB, являющийся спирторастворимой аминовой солью сульфированного фталоцианина меди и позволяющий выявлять липопротеины, входящие в состав миелиновых оболочек. В последние годы количественную оценку клиренса миелина с помощью этого метода применяют на различных моделях механического повреждения нервных стволов грызунов [17].

В нашей работе установлено, что количество миелиновых волокон после травмы значительно снижается к 7 суткам и постепенно возрастает на 21–60-е сутки после наложения лигатуры. Полученные данные относительно динамики миелина согласуются с результатами исследований других авторов, выполненных на разных экспериментальных моделях механической травмы нерва [17].

Установлено, что снижение плотности распределения миелиновых волокон через 7 суток после операции и постепенное их увеличение в более поздние сроки коррелирует с изменениями в плотности распределения нервных волокон, изученных с помощью ИГХ реакции на альфа-тубулин – белок микротрубочек, являющийся маркером осевых цилиндров нервных волокон. Показано уменьшение аксонов в дистальном сегменте нерва через 7 суток после травмы, а затем по мере роста регенерирующих нервных волокон из проксимального сегмента на периферию постепенное увеличение их количества. Через 21–60 суток площадь, занимаемая нервными волокнами в дистальном сегменте поврежденного нерва, постепенно увеличивается. Оценка площади, занимаемой αT^+ структурами, показала, что в последний срок наблюдений (60 суток) плотность распределения нервных волокон не достигает уровня интактного нерва.

Дегенерация нервных волокон, происходящая в дистальном сегменте нерва после травмы, сопровождается нарушением целостности периневральной оболочки. Периневрий наряду с другими оболочками нерва – эпиневрием и эндоневрием, окружая нервные волокна, способствует их сохранности и регенерации. Кроме того, он выполняет важную барьерную функцию [18]. Периневрий является одним из компонентов гематоневрального барьера [19], регулирующего поток элементов интерстициальной жидкости между эпиневрием и эндоневрием. На сегодняшний день для идентификации клеток периневрия нет специального селективного маркера, поэтому для определения периневральных клеток в экспериментальных исследованиях используют ИГХ реакцию на белки плотных контактов (окклюдин, Cldn-1, Cldn-5, белки ZO-1 и ZO-2) [20]. Полученные в настоящем исследовании данные о нарушении клаудинсодержащих структур

в периневрии нерва после повреждения согласуются с данными других авторов [21]. Вторым компонентом гематоневрального барьера служит эндотелий эндоневральных микрососудов. В настоящем исследовании нам не удалось выявить Cldn-1-содержащие эндотелиальные клетки. Предположительно, в формировании межэндотелиальных плотных контактов принимают участие другие белки.

Дисфункция гематоневрального барьера, вызванная повреждением нерва, регулируется макрофагами [22]. Следствием нарушения гематоневрального барьера явилось увеличение в эндоневрии макрофагов гематогенного происхождения. Для верификации макрофагов мы использовали маркер моноклеарных фагоцитов – белок Iba-1, который экспрессируется в микроглиальных клетках центральной нервной системы [23], а также макрофагах периферических органов, в том числе периферического нерва [16, 24]. В интактном нерве число макрофагов невелико: выявляется только популяция резидентных макрофагов. Резидентные макрофаги нерва имеют ряд особенностей. Считается, что они заселяют нервы в пренатальный период развития и сохраняют способность к пролиферации. Одной из их функций является уборка продуктов распада миелина в первые сутки после повреждения, до того момента, когда в эндоневрий начнут мигрировать гематогенные моноциты/макрофаги [25]. Через 7 суток число макрофагов заметно возрастает. Помимо участия в фагоцитозе продуктов распада миелина они вырабатывают ряд биологически активных веществ и создают необходимое микроокружение для регенерации нервных волокон. Отмечено, что максимальное увеличение числа макрофагов через 7 суток после операции соответствует минимальному содержанию миелина. Увеличение числа миелиновых волокон в процессе регенерации через 21 сутки и 60 суток приводит к снижению числа макрофагов. Известно, что макрофаги и ШК (основные миелинообразующие клетки периферической нервной системы) в регенерирующем нерве находятся в тесных взаимоотношениях. В литературе имеются данные о том, что ШК могут влиять на активацию макрофагов в нерве и на процесс их поляризации в провоспалительный фенотип M1 и противовоспалительный M2 [26], в то же время считается, что макрофаги регулируют динамику ШК после повреждения нервных проводников, в частности процесс их дедифференцировки. В нашем исследовании в срок, когда наблюдается пик миграции макрофагов (7 суток), в дистальном сегменте нерва обнаруживаются дедифференцированные ШК (нейролеммоциты), которые обладают характерными для них свойствами: не являются миелинизирующими, способны экспрессировать глиальный кислый фибриллярный белок и делиться. Выяснение особенностей взаимодействия ШК и макрофагов эндоневрия важно для понимания механизмов регуляции репаративных процессов в нервных проводниках после травмы и нуждается в дальнейшем исследовании.

Заключение

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование структурных изменений, происходящих в дистальном сегменте седалищного нерва крысы после наложения лигатуры (40 секунд). С использованием современных гистохимических и иммуногистохимических методов изучены следующие процессы валлеровской дегенерации: де- и ремиелинизация нервных волокон, динамика роста регенерирующих аксонов и плотность распределения макрофагов в разные сроки после повреждения. Впервые на данной модели повреждения нерва применен метод изучения клиренса миелина с помощью гистохимического окрашивания люксолевым прочным синим. Показано, что через 7 суток после повреждения большинство нервных волокон подвергается деструкции, а их миелиновые оболочки распадаются. Эти процессы сопровождаются нарушением гематоневрального барьера и миграцией в эндоневрий нервного ствола гематогенных макрофагов. Шванновские клетки в этот срок дедифференцируются. Об этом свидетельствуют экспрессия ими маркера дедифференцировки шванновских клеток GFAP и их способность к митотическому делению. Через 21–60 суток наблюдается ремиелинизация регенерирующих из проксимального сегмента нервных волокон. Полученные результаты предполагается использовать в дальнейших исследованиях по поиску новых способов стимуляции поврежденных нервов с применением клеточной терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.С. Петрова.
Сбор и обработка материала – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.
Написание текста – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.
Редактирование – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.S. Petrova.
Collected the data and performed the analysis – E.A. Kolos, E.S. Petrova.
Wrote the paper – E.A. Kolos, E.S. Petrova.
Edited the manuscript – E.A. Kolos, E.S. Petrova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Sarhane KA, Qiu C, Harris TGW, Hanwright PJ, Mao HQ, Tuffaha SH. Translational bioengineering strategies for peripheral nerve regeneration: opportunities, challenges, and novel concepts. *Neural Regen Res.* 2023;18(6):1229–34. DOI: 10.4103/1673-5374.358616.
2. Литвиненко И.В., Одинак М.М., Живолупов С.А., Булатов А.Р., Рашидов Н.А., Бардаков С.Н. Клинико-инструментальные характеристики травматических поражений периферических нервов конечностей. *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 2018;3(63):50–56. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37298620> (получено 01.12.2022).
Litvinenko IV, Odinak MM, Zhivolupov SA, Bulatov AR, Rashidov NA, Bardakov SN. Clinical and instrumental characteristics of traumatic lesions of peripheral nerves of limbs. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2018;3(63):50–56 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37298620> (accessed 01.12.2022).
3. Нуут А.Ю., Фомин Н.Ф. Нерешенные проблемы реконструктивной хирургии периферических нервов. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии.* 2019;12(2):127–133. DOI: 10.18499/2070-478X-2019-12-2-127-133.
Nisht AYu, Fomin NF. Unsolved problems of peripheral nerves reconstructive surgery. *Journal of Experimental and Clinical Surgery.* 2019;12(2):127–133 (In Russ.). DOI: 10.18499/2070-478X-2019-12-2-127-133.
4. Chu XL, Song XZ, Li Q, Li YR, He F, Gu XS et al. Basic mechanisms of peripheral nerve injury and treatment via electrical stimulation. *Neural Regen Res.* 2022;17(10):2185–93. DOI: 10.4103/1673-5374.335823.
5. Тутуров А.О., Пятин В.Ф., Сергеев С.М. Перспективы развития технологий восстановления протяженных дефектов нервов с помощью кондуитов. *Политравма.* 2019;2:95–101. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38557462> (получено 01.12.2022).
Tuturov AO, Pyatin VF, Sergeev SM. Prospects for development of technologies for restoration of extended nerve defects with use of conduits. *Polytrauma.* 2019;2:95–101 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38557462> (accessed 01.12.2022).
6. Sarker MD, Naghie S, McInnes AD, Schreyer DJ, Chen X. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. *Prog Neurobiol.* 2018;171:125–50. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.07.002.
7. Parker BJ, Rhodes DI, O'Brien CM, Rodda AE, Cameron NR. Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: a commercial perspective. *Acta Biomater.* 2021;135:64–86. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.08.052.
8. Нуут А.Ю., Чирский В.С., Фомин Н.Ф. Морфологическая характеристика изменений периферических нервов и тканей целевых зон при соединении периферических нервов по типу «конец в бок» в эксперименте. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2020;9(1):40–48. DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.40-48.
Nisht AYu, Chirskij VS, Fomin NF. Morphological characteristics of changes in peripheral nerves and tissues of target zones after the “end to side” neurotomy in an experiment. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(1):40–48 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.40-48.
9. Mathot F, Shin AY, van Wijnen AJ. Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair. *Gene.* 2019;710:17–23. DOI: 10.1016/j.gene.2019.02.078.
10. Kubiak CA, Grochmal J, Kung TA, Cederna PS, Midha R, Kemp SWP. Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2020;61(4):449–59. DOI: 10.1002/mus.26760.
11. Siemionow M, Strojny MM, Kozłowska K, Brodowska S, Grau-Kazmierczak W, Cwykiel J. Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration. *Stem*

- Cell Rev Rep. 2022;18(2):642–59. DOI: 10.1007/s12015-021-10301-z.
12. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Регенерация нервных волокон седалищного нерва крысы после повреждения и введения мезенхимных стволовых клеток. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2020;106(9):1059–1068. DOI: 10.31857/S0869813920070055.
Petrova ES, Kolos EA. Regeneration of nerve fibers of the rat sciatic nerve after damage and injection of MSCs. Russian Journal of Physiology. 2020;106(9):1059–1068 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0869813920070055.
 13. *Masgutov R, Zeinalova A, Masgutova G, Salafutdinov I, Garantina E, Syromiatnikova V et al.* Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of plasmid *pBud-coV-EGF165-coFGF2* into the intact rat sciatic nerve. Neural Regen Res. 2021;16(9):1882–9. DOI: 10.4103/1673-5374.306090.
 14. *Idrisova KF, Zeinalova AK, Masgutova GA, Bogov AA, Allegrucci C, Syromiatnikova VY et al.* Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. Neural Regen Res. 2022;17(6):1240–7. DOI: 10.4103/1673-5374.327329.
 15. *Kerns JM, Walter JS, Patetta MJ, Sood A, Hussain AK, Chung JJ et al.* Histological assessment of Wallerian degeneration of the rat tibial nerve following crush and transection injuries. J Reconstr Microsurg. 2021;37(5):391–404. DOI: 10.1055/s-0040-1716870.
 16. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Iba-1-иммунопозитивные клетки в седалищном нерве крысы в норме и при патологии. В сб.: Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практические аспекты. Уфа: РИЦ БашГУ, 2022. С. 226–230. DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.24.
Petrova ES, Kolos EA. Iba-1-immunopositive cells in the sciatic nerve of rats in normal and pathological conditions. In: *Sovremennaya neirobiologiya: fundamental'nye issledovaniya i prakticheskie aspekty.* Ufa: RIC BashGU, 2022. P. 226–230 (In Russ.). DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.24.
 17. *Otake K, Toriumi T, Ito T, Okuwa Y, Moriguchi K, Tanaka S et al.* Recovery of sensory function after the implantation of oriented-collagen tube into the resected rat sciatic nerve. Regen Ther. 2020;14:48–58. DOI: 10.1016/j.reth.2019.12.004.
 18. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Иммуногистохимическое исследование периневрия. В сб.: Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека. Курск: Издательство КГМУ, 2022. С. 296–303. DOI: 10.21626/cb.22.humanmorphology.
Petrova ES, Kolos EA. Immunohistochemical study of the perineurium. In: *Sovremennye aspekty morfologii, patomorfologii i onkopatologii organizma cheloveka.* Kursk: Izdatel'stvo KGMU, 2022. P. 296–303 (In Russ.). DOI: 10.21626/cb.22.humanmorphology.
 19. *Ubogu EE.* Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. Exp Neurol. 2020;328:113272. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113272.
 20. *Tsukita S, Tanaka H, Tamura A.* The claudins: from tight junctions to biological systems. Trends Biochem Sci. 2019;44(2):141–52. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.09.008.
 21. *Reinhold AK, Schwabe J, Lux TJ, Salvador E, Rittner HL.* Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy. Front Neurosci. 2018;12:936. DOI: 10.3389/fnins.2018.00936
 22. *Xu J, Wen J, Fu L, Liao L, Zou Y, Zhang J et al.* Macrophage-specific RhoA knockout delays Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in mice. J Neuroinflammation. 2021;18(1):234. DOI: 10.1186/s12974-021-02292-y.
 23. *Kolos EA, Korzhevskii DE.* Spinal cord microglia in health and disease. Acta Naturae. 2020;12(1):4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
 24. *Kwilasz AJ, Green Fulgham SM, Ellis A, Patel HP, Duran-Malle JC, Favret J et al.* A single peri-sciatic nerve administration of the adenosine 2A receptor agonist ATL313 produces long-lasting anti-allodynia and anti-inflammatory effects in male rats. Brain Behav Immun. 2019;76:116–25. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.11.011.
 25. *Kolter J, Kierdorf K, Henneke P.* Origin and differentiation of nerve-associated macrophages. J Immunol. 2020;204(2):271–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1901077.
 26. *Stratton JA, Holmes A, Rosin NL, Sinha S, Vohra M, Burma NE et al.* Macrophages regulate Schwann cell maturation after nerve injury. J Cell Rep. 2018;24(10):2561–72.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.004.

Информация об авторах

Елена Сергеевна Петрова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной гистологии и конфокальной микроскопии отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Елена Андреевна Колос – научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Author information

Elena S. Petrova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Histology and Confocal Microscopy, Department of General and Local Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0003-0972-8658>

Elena A. Kolos – Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Local Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-9643-6831>

Изменения формирования селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс, развивавшихся при низкодозовом воздействии эндокринного дисраптора ДДТ

Б.Б. Гагулаева, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.В. Яглов

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

Резюме. Введение. Воздействие эндокринных дисрапторов на развивающийся организм рассматривается как объективный фактор риска нарушения функционирования органов. К наиболее распространенным дисрапторам относится дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Он начинает свое воздействие еще во внутриутробном периоде, поскольку легко проникает через фетоплацентарный барьер. Последствия воздействия низких доз ДДТ на развитие и функционирование органов иммунной защиты неизвестны. Цель исследования – изучить формирование селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 30 самцах крыс Вистар в возрасте 7 суток, разделенных на две группы. Опытную группу (n=14) составило потомство самок, потреблявших вместо воды раствор *o,p*-ДДТ (20 мкг/л) в течение беременности и молочного вскармливания. Определяли анатомические и гистоморфометрические параметры развития селезенки. Оценивали содержание Т- и В-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, масса селезенки не отличалась от контрольных значений. Белая пульпа была представлена формирующимися периартериальными лимфоидными муфтами, которые имели большие размеры, но менее плотное расположение клеток. Маргинальная зона обнаруживалась у большего числа лимфоидных муфт по сравнению с контролем. Ее размеры превышали контрольные значения, но количество клеток в 1 мм² площади было меньше, а гранулоциты не выявлялись. Количество клеток в 1 мм² красной пульпы, включая мегакариоциты, не отличалось от значений контрольной группы, но содержание гранулоцитов было большим. Численность дифференцированных В- и Т-клеток в селезенке была пониженной. **Заключение.** Селезенка крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, характеризовалась более быстрыми темпами формирования белой пульпы и в то же время замедлением терминальной дифференцировки лимфоцитов и темпов миграции нейтрофилов в селезенку.

Ключевые слова: селезенка, гистогенез, эндокринный дисраптор, ДДТ, лимфоциты

Для корреспонденции: Наталья Валентиновна Яглова. E-mail: yaglova@mail.ru

Для цитирования: Гагулаева Б.Б., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Изменения формирования селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс, развивавшихся при низкодозовом воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):71–79. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.71-79.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-25-00012.

Статья поступила 26.04.2023. Получена после рецензирования 12.05.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Effects of low doses of endocrine disruptor DDT on early postnatal spleen development in rats

B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, V.V. Yaglov

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrowsky National Research Center of Surgery", Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Exposure of a developing body to endocrine disrupting chemicals is considered to be a risk factor for organ disorders. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is known as one of the most wide-spread endocrine disruptors, the exposure to which begins in the prenatal period because of its ability to penetrate the placental barrier. The effects of low-dose DDT exposure on the immune system development are poorly studied, so we aimed to evaluate spleen development in the early postnatal period in rats exposed to DDT.

Materials and methods. The study was performed on 2 groups of rats. The control one included 16 7-day-old male Wistar rats, whereas the experimental group consisted of 14 offspring of females that consumed a solution of *o,p*-DDT (20 µg/l) during pregnancy and lactation. We evaluated anatomical and histomorphometric parameters of spleen development and counted B- and T-lymphocytes with flow cytometry.

Results. The DDT exposure did not influence the weight of the spleen. The white pulp had periarterial lymphoid sheaths, which were larger in size and had a less dense arrangement of cells. The marginal zone was found in a larger number of lymphoid sheaths and was of a greater area. However, the number of cells in 1 mm² was lower and we detected no granulocytes. In the red pulp, the number of cells in 1 mm² (including megakaryocytes) did not differ from the values of the control group, but the content of granulocytes was higher. We observed a reduced number of differentiated B- and T-cells.

Conclusion. The spleens of the experimental rats were characterized by a faster formation of the white pulp and slower rates of terminal lymphocyte differentiation and neutrophil migration into the spleen.

Keywords: spleen, histogenesis, endocrine disruptor, DDT, lymphocytes

Corresponding author: Natalya V. Yaglova. E-mail: yaglova@mail.ru

For citation: Gagulaeva B.B., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Effects of low doses of endocrine disruptor DDT on early postnatal spleen development in rats. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(4):71–79 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.71-79.

Funding. The study was supported by the Russian Scientific Foundation, grant No. 23-25-00012.

Received 26.04.2023. **Received in revised form** 12.05.2023. **Accepted** 20.06.2023.

Введение

В настоящее время воздействие фоновых доз эндокринных дисрапторов на развивающийся организм рассматривается как объективный фактор риска нарушения функционирования органов, реализации защитных реакций и развития патологических процессов [1–3]. Эндокринные дисрапторы начинают воздействовать еще во внутриутробном периоде, поскольку в большинстве своем обладают малой молекулярной массой и высокой липофильностью, что позволяет им легко проникать через фетоплацентарный барьер, а также экскретироваться с молоком [4–6]. Пренатальное воздействие, нарушающее синтез и сигналинг гормонов и негеномное наследование, может не только оказывать влияние на развитие органов плода, но и вызывать скрытые изменения, которые будут проявляться в разные периоды постнатального развития, в том числе манифестировать и у взрослых [7]. Эти изменения могут быть как функционального, так и морфологического характера. На сегодняшний день концепция DONAD (Developmental origins of health and disease), утверждающая, что и здоровье, и болезни взрослого организма являются следствием событий, происходящих во внутриутробном периоде, получила широкое признание [8, 9]. Благодаря ей удалось вскрыть причины ряда патологий, ранее относившихся к болезням с наследственной предрасположенностью или действию стрессорных факторов, зачастую являющихся триггерами, а не причиной развития патологических процессов. Эндокринные дисрапторы занимают одно из первых мест среди неблагоприятных факторов, действующих на развивающийся организм [10–12]. Воздействие многих из них носит облигатный характер и, как правило, не связано с профессиональными вредностями. К наиболее распространенным в природе персистирующим загрязнителям относится дихлордифенилтри-

хлорэтан (ДДТ) [13]. Он характеризуется длительным периодом распада и способностью к депонированию в организме [14]. ДДТ – известный эндокринный дисраптор с антиандрогенными и анти тиреоидными свойствами [15–18]. Также он способен нарушать развитие и функционирование надпочечных желез [19, 20]. Скрининговые исследования показывают, что пренатальное воздействие ДДТ приводит к эндокринным и метаболическим нарушениям, ожирению и, как следствие, потенцированию эндокринной и иммунной дисфункции, обуславливающей повышенный риск развития гормонозависимых опухолей [12, 21]. Последствия воздействия ДДТ на развитие и функционирование органов иммунной защиты были изучены в меньшей степени. Имеются сведения, что пренатальное и постнатальное воздействие низких доз ДДТ способно изменять морфогенетические процессы в центральном органе лимфоидной системы – тимусе [22]. Следовательно, это может порождать изменения и в развитии вторичных лимфоидных образований как напрямую, вследствие действия самого эндокринного дисраптора, так и косвенно через изменения в центральных органах иммунной защиты.

Селезенка является крупнейшим лимфоидным образованием в организме млекопитающих и человека, ее роль в реализации иммунных функций значительна. По имеющимся сведениям, развитие и функционирование селезенки не только зависят от внешних факторов, но и определяются состоянием иммунной и эндокринной систем материнского организма [23, 24]. У грызунов формирование лимфоидных образований в селезенке в отличие от человека происходит не во внутриутробном, а в раннем постнатальном развитии, что делает эти два периода очень важными при оценке последствий воздействия эндокринных дисрапторов.

В связи со всем сказанным целью настоящего исследования было изучение формирования селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар в возрасте 7 суток ($n=30$). Опытную группу ($n=14$) составило потомство самок, потреблявших вместо питьевой воды раствор *o,p*-ДДТ с концентрацией действующего вещества 20 мкг/л в течение всей беременности и периода молочного вскармливания потомства. Потребление ДДТ самками в течение беременности составило $2,72 \pm 0,18$ мкг/кг, что соответствует уровню потребления данного вещества населением с продуктами питания с учетом различий в метаболизме ДДТ человека и крысы [10, 11]. Отсутствие в корме и воде ДДТ и его метаболитов было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Контрольную группу ($n=16$) составило потомство интактных самок соответствующего возраста. Животных контрольной и экспериментальной групп выводили из эксперимента передозировкой хлороформного наркоза. Определяли массу тела и массу селезенки с помощью аналитических весов («Сартогосм», Россия), а также рассчитывали относительную массу органа. Селезенку фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной проводки изготавливали срезы, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Для компьютерной морфометрии использовали программу ImageScope (Leica Microsystems, Германия). Наряду с этим получали первичную культуру спленоцитов. Спленоциты выделяли путем гомогенизации селезенки в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с продавливанием через сетки с отверстиями 40 мкм для отделения от стромы. Клеточную взвесь дважды центрифугировали и отмывали в той же среде в течение 5 минут при 1000 об/мин. Доводили до концентрации 10 млн клеток в 1 мл. Проводили цитофлуориметри-

ческое исследование спленоцитов с использованием антител к CD3, CD45R, конъюгированных с флуорохромами (eBioscience, США), для определения содержания Т- и В-лимфоцитов, соответственно. Процедуру пробоподготовки осуществляли по стандартным протоколам. Для исследования использовали проточный цитометр FC500 (Beckman Coulter, США).

Эксперимент проведен в соответствии с нормами и правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено локальной этической комиссией НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына (протокол № 28(4) от 27.10.2021).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,01$.

Результаты

У крыс контрольной группы в возрасте 7 суток селезенка представляла собой орган продольной формы темно-красного цвета, покрытый соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходили тонкие соединительнотканнные трабекулы. Ее абсолютная и относительная масса была невелика (табл.).

Доля белой пульпы на 7-е сутки постнатального развития была небольшой и в среднем не превышала 6% общей площади среза органа (табл.). Белая пульпа состояла из периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) с формирующейся маргинальной зоной (табл.). Лимфоидные муфты представляли собой плот-

Таблица | Table

Морфологические характеристики селезенки 7-дневных крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, и контрольной группы ($M \pm m$) | Morphological parameters of 7-day-old rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disruptor DDT and the control rats ($M \pm m$)

Параметр Parameter	Группа Group	
	контроль control	ДДТ DDT
Абсолютная масса органа, г Absolute organ weight, g	0,063±0,002	0,070±0,002
Относительная масса органа, % Relative organ weight, %	0,499±0,02	0,508±0,02
Доля белой пульпы, % White pulp portion, %	5,98±0,52	8,11±0,58*
Доля ПАЛМ, % PALS portion, %	4,76±0,27	6,31±0,30*
Доля маргинальной зоны, % Marginal zone portion, %	1,22±0,12	1,80±0,14*

* – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,01$)

* – statistically significant differences from the control group ($p < 0.01$)

но лежащие скопления лимфоцитов вокруг артериол (рис. 1 А). Приблизительно у четверти лимфоидных муфт выявлялась маргинальная зона (рис. 1 С). Маргинальная зона была представлена в основном мононуклеарными клетками и небольшим количеством гранулоцитов (рис. 2).

Красная пульпа состояла из ретикулярной ткани с расположенными в ней многочисленными гемопоэтическими клетками (рис. 3 А, С). Среди клеток красной пульпы встречались единичные, в основном сегментоядерные, гранулоциты (рис. 3 D) и мегакарициты (рис. 3 E).

У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, селезенка имела строение, аналогичное строению органа потомства контрольной

группы. Относительная и абсолютная масса селезенки не отличалась от контрольных значений (табл.).

Белая пульпа была представлена формирующимися ПАЛМ, но площадь, занимаемая ими, оказалась значимо больше, чем у животных контрольной группы (табл.). Лимфоидные муфты вокруг артериол отличались менее плотным расположением клеток (рис. 1 В, D). Они имели бóльшие размеры, при этом маргинальная зона обнаруживалась более чем у половины лимфоидных муфт (рис. 1 С). Ее размеры также превышали значения контрольной группы (табл.). Маргинальная зона представляла собой скопление мононуклеарных клеток, но их количество в единице площади было на 20% меньше, чем в контрольной группе, а гранулоциты не выявлялись (рис. 2).

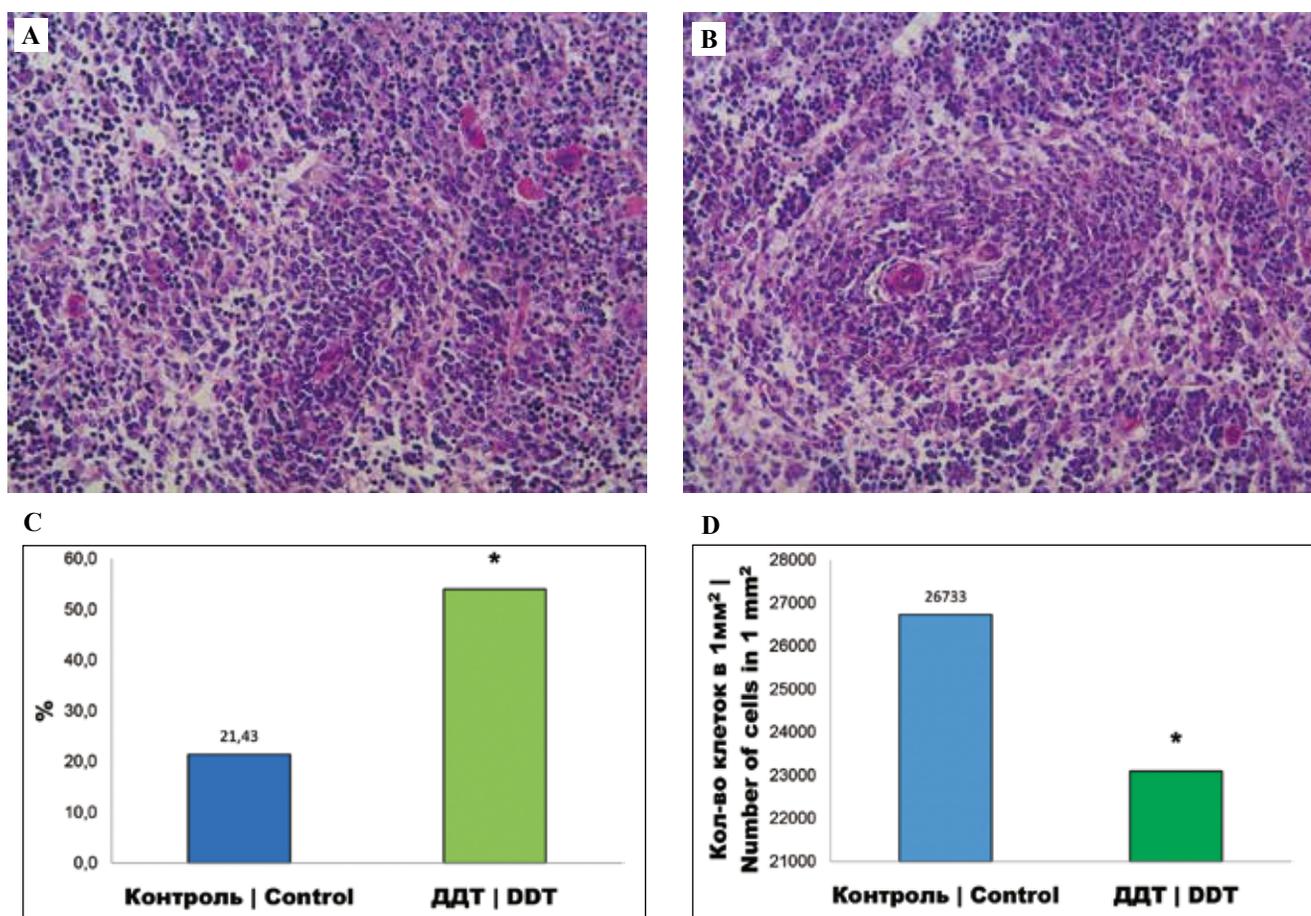


Рис. 1. Структурные особенности ПАЛМ селезенки у 7-дневных крыс контрольной группы и подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ.

Гистологическое строение ПАЛМ селезенки у 7-дневных крыс контрольной группы (А) и подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ (В). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$. С – процент лимфоидных муфт с маргинальной зоной ($M \pm m$). D – плотность расположения лимфоцитов в ПАЛМ ($M \pm m$)

* – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,01$)

Fig. 1. Differences in structure of splenic PALS in the 7-day-old control rats and the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT.

Histological structure of splenic PALS in the 7-day-old control rats (A) and the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT (B). H&E staining. $\times 200$. C – percentage of lymphoid sheaths with marginal zone ($M \pm m$). D – lymphocyte density in PALS ($M \pm m$)

* – statistically significant differences from the control group ($p < 0,01$)

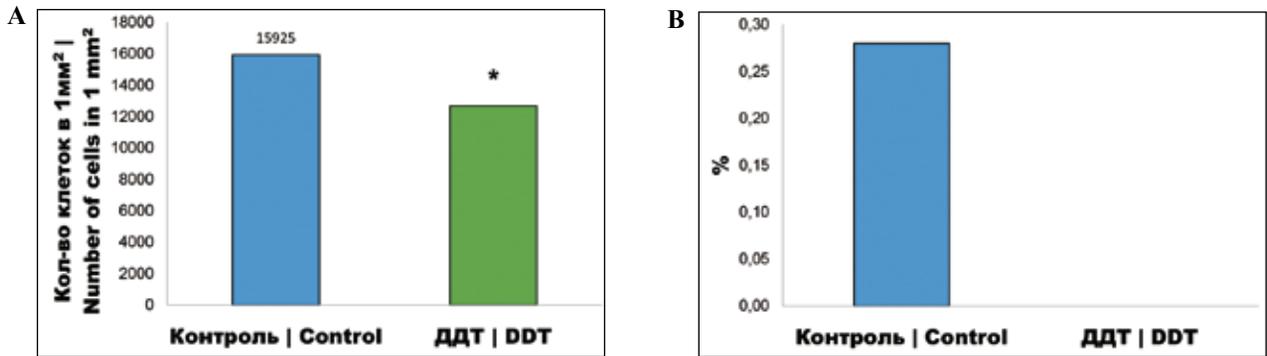


Рис. 2. Клеточный состав маргинальной зоны селезенки у 7-дневных крыс контрольной группы и подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ.

А – общее количество клеток в 1 мм² площади маргинальной зоны, В – доля гранулоцитов в клеточном составе (M±m)
* – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,01)

Fig. 2. Cell content of marginal zone in the 7-day-old control rats and the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT.

А – total number of cells in 1 mm² of marginal zone area, В – percentage of granulocytes in cell content (M±m)

* – statistically significant differences from the control group (p<0.01)

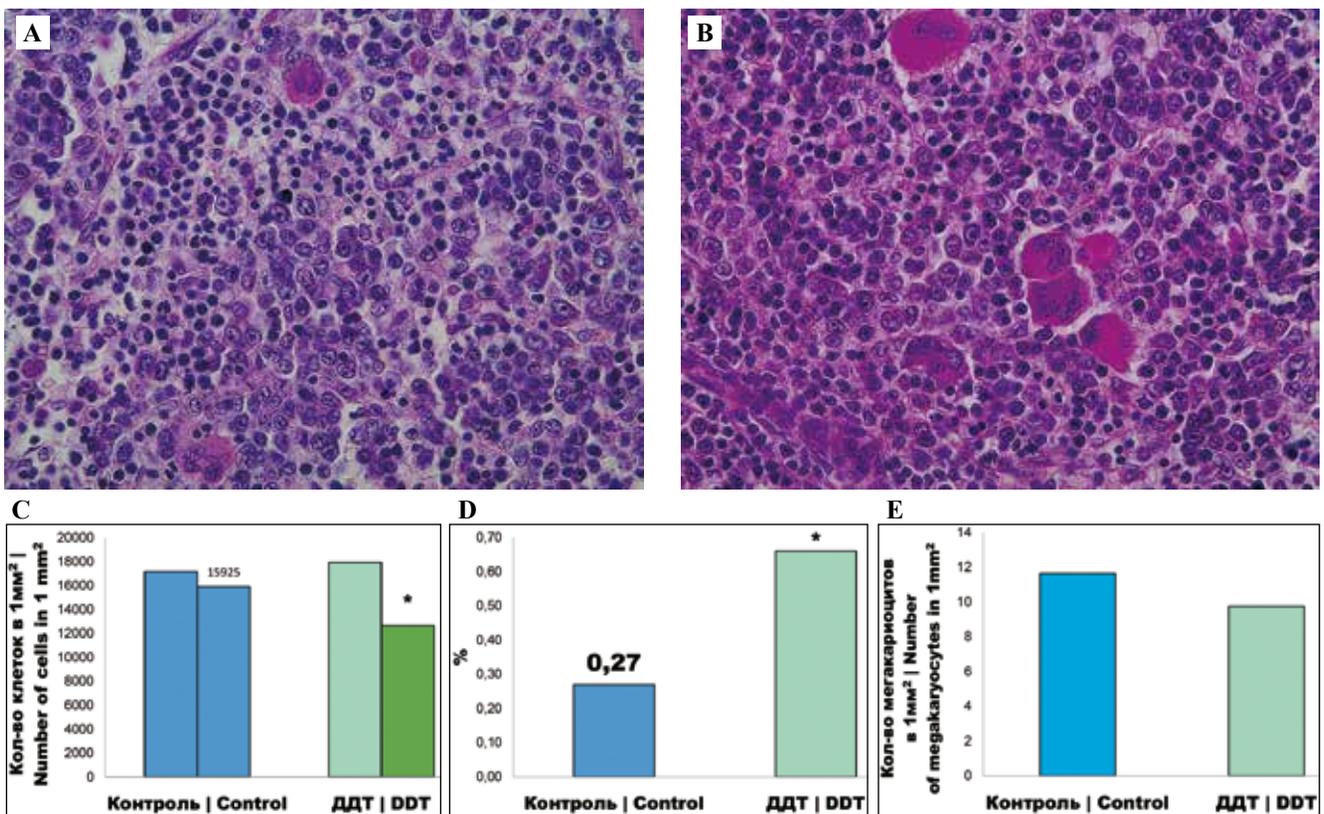


Рис. 3. Морфологические характеристики красной пульпы селезенки у 7-дневных крыс контрольной группы и подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ.

А – красная пульпа селезенки крыс контрольной группы, В – красная пульпа селезенки крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ. Окраска гематоксилином и эозином, ×400. С – общее количество клеток в 1 мм² площади красной пульпы. D – доля гранулоцитов в клеточном составе.

Е – количество мегакариоцитов в 1 мм² площади красной пульпы (M±m)

* – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,01)

Fig. 3. Morphological parameters of splenic red pulp in the 7-day-old control rats and the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT.

А – splenic red pulp of the control rats, В – splenic red pulp of the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT. H&E staining. ×400. С – total number of cells in 1 mm² of the red pulp area. D – percentage of granulocytes in cell content. E – number of megakaryocytes in 1 mm² of the red pulp area (M±m)

* – statistically significant differences from the control group (p<0.01)

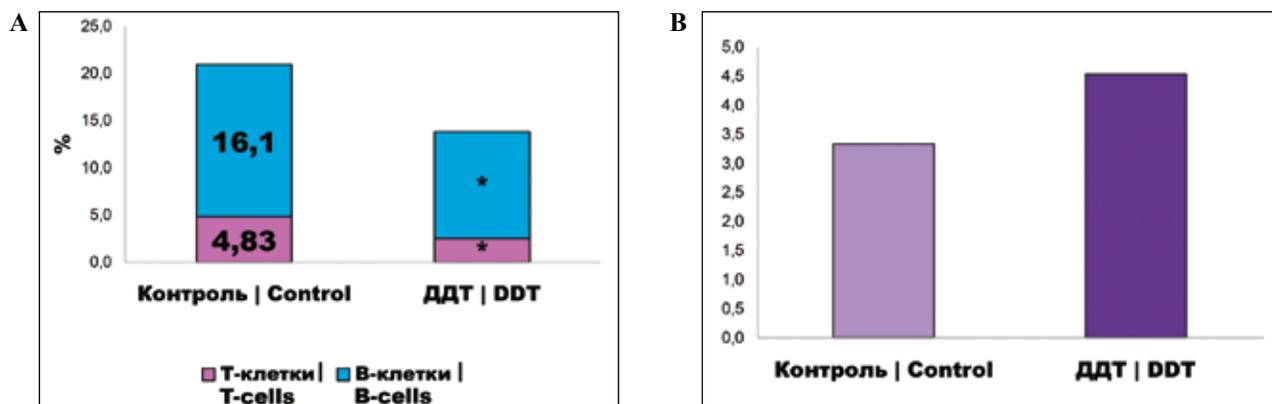


Рис. 4. Доля дифференцированных Т- и В-клеток (А) и соотношение В- и Т-клеток (В) ($M \pm m$) в селезенке у 7-дневных крыс контрольной группы и подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ
* – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,01$)

Fig. 4. Percentage of differentiated T- and B-cells (A) and B/T cell ratio (B) ($M \pm m$) in the spleen of the 7-day-old control rats and the rats prenatally and postnatally exposed to endocrine disrupter DDT
* – statistically significant differences from the control group ($p < 0.01$)

Красная пульпа содержала большое количество гемопоэтических клеток (рис. 3 В). Количество клеток в единице площади красной пульпы по сравнению со значениями контрольной группы не отличалось (рис. 3 С), но содержание гранулоцитов у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, было большим (рис. 3 D). Количество мегакариоцитов в красной пульпе практически не отличалось от показателей контрольной группы (рис. 3 Е).

Цитофлуориметрическое исследование показало, что селезенка крыс в возрасте 7 суток представляла собой скопление большого числа низкодифференцированных гемопоэтических клеток. Содержание дифференцированных лимфоцитов было невелико, в среднем составляло 20% у крыс контрольной группы (рис. 4 А). Количество В-клеток явно превалировало над Т-клетками и составляло приблизительно три четверти дифференцированных лимфоцитов селезенки (рис. 4 В).

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ, содержание дифференцированных лимфоцитов оказалась на треть меньшим (рис. 4 А). При этом численность и В-, и Т-клеток была пониженной. Среди дифференцированных лимфоцитов также преобладали В-клетки (рис. 4 В).

Обсуждение

Селезенка крыс в раннем постнатальном периоде представляет собой формирующийся орган иммунной защиты и активно функционирующий участок экстрамедуллярного гемопоэза [25, 26]. У крыс контрольной группы оба эти компонента были хорошо выражены. Наблюдалось формирование белой пульпы, представленной примитивными ПАЛМ, вокруг которых начинала формироваться маргинальная зона. У грызунов формирование маргинальной зоны происходит с 5-х по 10-е сутки постнатального развития [27, 28]. У крыс,

развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, формирование белой пульпы происходило более активно, о чем свидетельствуют и большие размеры ПАЛМ, и больший процент лимфоидных муфт, вокруг которых формировалась маргинальная зона. Маргинальная зона является первой линией контакта иммунокомпетентных клеток с антигеном, способной производить большое количество нейтрализующих антител в течение короткого периода для предотвращения бактериемии [29]. Она представляет собой систему мгновенного реагирования на переносимые кровью антигены и обладает широкой специфичностью. В маргинальной зоне содержатся макрофаги, маргинальные металлофильные макрофаги и В-клетки маргинальной зоны. Кроме того, в ней находится множество транзитных клеток крови, включая лимфоциты и гранулоциты. Появление нейтрофилов в селезенке начинается в пренатальном периоде и продолжается после рождения, что связано с колонизацией кишечника микрофлорой и поступлением липополисахаридов в системный кровоток [30]. Нейтрофилы играют важную роль в стимуляции синтеза иммуноглобулинов в маргинальной зоне [30]. У крыс контрольной группы помимо мононуклеарных клеток в маргинальной зоне присутствовали и гранулоциты, а именно нейтрофилы, так как другие виды гранулоцитов у крыс встречаются в крайне небольших количествах. Появление в еще несформированной маргинальной зоне нейтрофилов свидетельствует о начале развития иммунного процесса, связанного с поступлением бактериальных антигенов собственной микрофлоры в кровоток. У крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора в пренатальном и постнатальном развитии, меньшая плотность клеток в селезенке могла быть связана с ее большей площадью, но отсутствие в ней нейтрофилов свидетельствует о замедлении формирования реакции иммунокомпетентных органов на антигены. Также при-

чиной может быть снижение гранулоцитопоза в селезенке. Гемопоэтические процессы были хорошо выражены в красной пульпе у крыс обеих групп. Ни общая численность гемопоэтических клеток, ни количество мегакариоцитов в единице площади не имели отличий, но содержание гранулоцитов в красной пульпе у крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, втрое превышало значения контрольной группы, что не позволяет считать интенсивность гранулоцитопоза пониженной. Возможно, что отсутствие нейтрофилов в маргинальной зоне связано с незрелостью клеток, в первую очередь лимфоцитов. Цитофлуориметрическое исследование выявило явное отставание в дифференцировке В-лимфоцитов в селезенке, что может быть причиной нарушения формирования кооперации клеток в маргинальной зоне. Известно, что Т-клетки селезенки имеют тимическое происхождение, а В-клетки образуются непосредственно в селезенке. Меньшее содержание Т-клеток свидетельствует об изменении процессов их созревания в тимусе и миграции в периферические лимфоидные образования. Эти данные вызывают закономерный вопрос о механизмах более выраженного формирования белой пульпы в органе. Цитофлуориметрический анализ в сочетании с морфометрическим исследованием гистологических препаратов показывает, что большая площадь ПАЛМ, вероятно, была обусловлена меньшей плотностью расположения лимфоидных клеток в муфтах. Но в то же время объективно темпы формирования ПАЛМ и их маргинальных зон выше, чем у интактных животных. Одинаковая численность гемопоэтических клеток в красной пульпе доказывает, что интенсивность гемопоэза в селезенке у крыс, развивавшихся при воздействии низких доз эндокринного дисрапатора ДДТ, не отличалась, но меньший процент В-клеток указывает на замедление дифференцировки лимфоцитов.

Заключение

Селезенка крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисрапатора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, характеризовалась более быстрыми темпами формирования белой пульпы и в то же время замедлением терминальной дифференцировки лимфоцитов и темпов миграции нейтрофилов в селезенку.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Яглова, В.В. Яглов.
Сбор и обработка материала – Б.Б. Гагулаева, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова.
Написание текста – Б.Б. Гагулаева.
Редактирование – В.В. Яглов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Yaglova, V.V. Yaglov.
Collected the data and performed the analysis – B.B. Gagulaeva, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, N.V. Yaglova.
Wrote the paper – B.B. Gagulaeva.
Edited the manuscript – V.V. Yaglov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Kassotis CD, Vandenberg LN, Demeneix BA, Porta M, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(8):719–30. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30128-5.
2. Ruiz D, Becerra M, Jagai JS, Ard K, Sargis RM. Disparities in environmental exposures to endocrine-disrupting chemicals and diabetes risk in vulnerable populations. *Diabetes Care.* 2018;41(1):193–205. DOI: 10.2337/dc16-2765.
3. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(3–5):204–15. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.
4. Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(8):703–18. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30129-7.
5. Kuang L, Hou Y, Huang F, Hong H, Sun H, Deng W et al. Pesticide residues in breast milk and the associated risk assessment: a review focused on China. *Sci Total Environ.* 2020;727:138412. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138412.
6. Rodprasert W, Toppari J, Virtanen HE. Endocrine disrupting chemicals and reproductive health in boys and men. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:706532. DOI: 10.3389/fendo.2021.706532.
7. Montjean D, Neyroud AS, Yefimova MG, Benkhalifa M, Cabry R, Ravel C. Impact of endocrine disruptors upon non-genetic inheritance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3350. DOI: 10.3390/ijms23063350.
8. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412–7. DOI:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
9. Fukuoka H. DOHaD (developmental origins of health and disease) and birth cohort research. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2015;61Suppl:S2–4. DOI: 10.3177/jnsv.61.S2.
10. Malits J, Naidu M, Trasande L. Exposure to endocrine disrupting chemicals in Canada: population-based estimates of disease burden and economic costs. *Toxics.* 2022;10(3):146. DOI: 10.3390/toxics10030146.
11. Attina TM, Hauser R, Sathyanarayana S, Hunt PA, Bourguignon JP, Myers JP et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(12):996–1003. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30275-3.
12. Valvi D, Mendez MA, Martinez D, Grimalt JO, Torrent M, Sunyer J et al. Prenatal concentrations of polychlorinated biphenyls, DDE, and DDT and overweight in children: a prospective birth cohort study. *Environ Health Perspect.* 2012;120(3):451–7. DOI: 10.1289/ehp.1103862.
13. Qi SY, Xu XL, Ma WZ, Deng SL, Lian ZX, Yu K. Effects of organochlorine pesticide residues in maternal body on infants. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:890307. DOI: 10.3389/fendo.2022.890307.
14. Jayaraj R, Megha P, Sreedev P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol.* 2016;9(3–4):90–100. DOI: 10.1515/intox-2016-0012.

15. Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, Farias P, de Jager C. Impaired semen quality associated with environmental ddt exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo province, South Africa. *J Androl.* 2007;28(3):423–34. DOI: 10.2164/jandrol.106.001701.
16. Bornman M, Delpont R, Farias P, Aneck-Hahn N, Patrick S, Millar RP et al. Alterations in male reproductive hormones in relation to environmental DDT exposure. *Environ Int.* 2018;113:281–9. DOI: 10.1016/j.envint.2017.12.039.
17. Cook MB, Trabert B, Mcglynn KA. Organochlorine compounds and testicular dysgenesis syndrome: human data. *Int J Androl.* 2011;34(4 Pt 2):e68–85. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2011.01171.x.
18. Yaglova NV, Yaglov VV. Cytophysiological changes in the follicular epithelium of the thyroid gland after long-term exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Bull Exp Biol Med.* 2017;162(5):699–702. DOI: 10.1007/s10517-017-3691-4.
19. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В., Обернихин С.С., Назимова С.В. Изменения секреторной деятельности адреноцитов крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Клиническая и экспериментальная морфология. 2018;3(27):30–34. DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-30-34.
- Yaglova NV, Tsomartova DA, Yaglov VV, Obernikhin SS, Nazimova SV. Altered secretion of adrenomedullary A-cells in rats after developmental exposure to low-dose dichlorodiphenyltrichloroethane. *Clinical and experimental morphology.* 2018;3(27):30–34 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-30-34.
20. Kyi-Tha-Thu C, Fujitani Y, Hirano S, Win-Shwe TT. Early-life exposure to traffic-related air pollutants induced anxiety-like behaviors in rats via neurotransmitters and neurotrophic factors. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):586. DOI: 10.3390/ijms24010586.
21. Cohn BA, Cirillo PM, Terry MB. DDT and breast cancer: prospective study of induction time and susceptibility windows. *J Natl Cancer Inst.* 2019;111(8):803–10. DOI:10.1093/jnci/djy198.
22. Yaglova NV, Tsomartova ES, Nazimova SV, Obernikhin SS, Mukhamedova SG, Pashina NR et al. Morphological changes in the thymus of newborn rats exposed to endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) during the prenatal period. *Bull Exp Biol Med.* 2019;167(2):297–9. DOI: 10.1007/s10517-019-04513-0.
23. Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс различных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина. Клиническая и экспериментальная морфология. 2019;8(4):49–58. DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.49-58.
- Arlashkina OM, Struchko GYu, Merkulova LM, Mikhailova MN. Changes in the spleen white pulp in the offspring of splenectomized rats of various ages exposed to 1,2-dimethylhydrazine. *Clinical and experimental morphology.* 2019;8(4):49–58 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.49-58.
24. Яглова Н.В., Обернихин С.С. Регуляторная роль тучных клеток в морфогенетических процессах органов иммунной системы потомства мышей, перенесших активацию иммунной системы в ранние сроки беременности. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013;2(6):62–68. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=rcmjft> (получено 17.04.2023).
- Yaglova NV, Obernikhin SS. Role of mast cells in development of immune system in offspring of exposed to activation of immunity in early pregnancy and intact murine dams. *Clinical and experimental morphology.* 2013;2(6):62–68 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=rcmjft> (accessed 17.04.2023).
25. Losco P. Normal development, growth, and aging of the spleen. In: U Mohr, DL Dungworth, CC Capen (eds.). *Pathobiology of the Aging Rat.* V. 1. Washington: ILSI Press, 1992. P. 75–94.
26. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell.* 2007;131(5):994–1008. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.047.
27. Kraal G, Mebius R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol.* 2006;250:175–215. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)50005-1.
28. Takeya M, Takahashi K. Ontogenic development of macrophage subpopulations and Ia-positive dendritic cells in fetal and neonatal rat spleen. *J Leukoc Biol.* 1992;52(5):516–23. DOI: 10.1002/jlb.52.5.516.
29. Haley PJ. The lymphoid system: a review of species differences. *J Toxicol Pathol.* 2017;30(2):111–23. DOI: 10.1293/tox.2016-0075.
30. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 2011;13(2):170–80. DOI: 10.1038/ni.2194.

Информация об авторах

Белла Борисовна Гагулаева – аспирантка НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Екатерина Петровна Тимохина – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Bella B. Gagulaeva – Postgraduate Student, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0002-1415-3070>

Natalya V. Yaglova – Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Endocrine System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

Sergey S. Obernikhin – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Ekaterina P. Timokhina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-0504-1488>

Valentin V. Yaglov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

Солидарная плазмоцитома верхней челюсти

*И.Д. Мусатов, А.С. Занозин, А.С. Тертычный, Е.Д. Тетерина,
С.Т. Авраимова, Н.С. Александров, В.С. Пауков*

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Институт клинической морфологии и цифровой патологии, Москва, Россия

Резюме. Описаны наблюдение редкой опухоли – солидарной плазмоцитомы (ПЛЦ) верхней челюсти и подходы к ее дифференциальной иммуногистохимической диагностике. Показано, что эта опухоль может иметь различную гистологическую картину и для ее диагностики необходимо иммуногистохимическое исследование с маркерами CD138, CD38, MUM1, CD79a, CD19, CD20, что позволяет дифференцировать ПЛЦ от других лимфоидных опухолей.

Ключевые слова: плазмоцитома, иммуногистохимия, гематология

Для корреспонденции: Игорь Дмитриевич Мусатов. E-mail: igor.1095@gmail.com

Для цитирования: Мусатов И.Д., Занозин А.С., Тертычный А.С., Тетерина Е.Д., Авраимова С.Т., Александров Н.С., Пауков В.С. Солидарная плазмоцитома верхней челюсти. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):80–84. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.80-84.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 04.04.2023. Получена после рецензирования 17.04.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Solitary plasmacytoma of the maxilla: a case report

I.D. Musatov, A.S. Zanozin, A.S. Tertychnyy, E.D. Teterina, S.T. Avraamova, N.S. Alexandrov, V.S. Paukov

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, Moscow, Russia

Abstract. We describe a rare case of solitary plasmacytoma (PLC) of the upper jaw and approaches to its differential immunohistochemical diagnosis. This tumor may demonstrate a different histological picture and its diagnosis requires immunohistochemical study with markers CD138, CD38, MUM1, CD79a, CD19, and CD20, which allows differentiating PLC from other lymphoid tumors.

Keywords: plasmacytoma, immunohistochemistry, hematology

Corresponding author: Igor D. Musatov. E-mail: igor.1095@gmail.com

For citation: Musatov I.D., Zanozin A.S., Tertychnyy A.S., Teterina E.D., Avraamova S.T., Alexandrov N.S., Paukov V.S. Solitary plasmacytoma of the maxilla: a case report. Clin. exp. morphology. 2023;12(4):80–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.80-84.

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

Received 04.04.2023. Received in revised form 17.04.2023. Accepted 20.06.2023.

Введение

Плазмноклеточные неоплазии (ПКН) – злокачественные новообразования из плазматических клеток, которые характеризуются различными клиническими и морфологическими вариантами, в связи с чем их диагностика имеет определенные трудности [1–3]. ПКН подразделяются на множественную миелому, локализирующуюся в костном мозге, и солидарную плазмоцитому, которая, в свою очередь, в зависимости от поражения костной или мягких тканей подразделяется на солидарную костную плазмоцитому и солидарную экстрамедуллярную плазмоцитому [1]. Клетки опухоли могут вырабатывать иммуноглобулины κ- или λ-легких цепей [2–4].

Плазмоцитома (ПЛЦ) – редкое заболевание, которое, по одним данным, встречается с частотой 0,15 на 100 000 человек, а по другим – 0,063 на 100 000 у женщин и 0,078 на 100 000 у мужчин [5]. Клиническими проявлениями этой патологии при поражении костной ткани могут быть боли в костях, переломы позвонков с последующим развитием компрессии спинного мозга. Поражение мягких тканей может проявляться ринореей, носовыми кровотечениями, заложенностью носа, пальпируемыми образованиями при увеличении мягких тканей носа, лимфаденопатией [3]. Дифференциальную диагностику необходимо проводить с такими заболеваниями как гигантоклеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны, гистиоцитоз из клеток Лангер-

ганса [3]. Диагностика ПЛЦ основывается на характерных клинических, лабораторных и рентгенологических данных, однако окончательный диагноз может быть поставлен только после комплексного морфологического исследования. Гистологическим критерием для диагноза «плазмоцитома» служит обнаружение в ткани опухоли моноклональных плазматических клеток, реже наличие плазмобластной или анапластической картины с иммуногистохимически (ИГХ) подтвержденной экспрессией маркеров – CD138, CD38, MUM1, а также с учетом клинических данных [1–3]. В статье описан редкий случай солитарной костной плазмоцитомы, встретившийся в нашей практике.

Клиническое наблюдение

Клинические данные

Пациент К., 59 лет, с ноября 2021 года отмечал затрудненное носовое дыхание справа, эпизодические кровотечения из левой половины носа, в связи с чем обращался к отоларингологу по месту жительства, где было назначено консервативное лечение, не давшее эффекта. В декабре 2021 года впервые сделана КТ носа и околоносовых пазух. Выявлено опухолевое образование правой верхнечелюстной пазухи с ее тотальным поражением и переходом опухоли на решетчатый лабиринт. С этими данными пациент поступил в университетскую клиническую больницу № 1 Сеченовского университета.

При осмотре выявлено новообразование на коже лица до 2 см в диаметре. Регионарные лимфатические узлы не увеличены. Показатели общего и биохимического анализа крови в пределах нормы. При проведении

КТ носа и околоносовых пазух обнаружено снижение пневматизации правой верхнечелюстной пазухи, а также основной и лобной пазух за счет мягкотканного содержимого. При проведении рентгенографии органов грудной полости очаговые и инфильтративные изменения не выявлены. Было принято решение о необходимости биопсии опухоли с целью верификации опухолевого процесса и определения дальнейшей тактики лечения. Выполнены разрез слизистой оболочки нёба в области верхней челюсти справа и гайморотомия. Операционный материал доставлен для гистологического исследования в центральное патологоанатомическое отделение (ЦПАО) Сеченовского университета.

Морфологическое исследование

В биопсийную лабораторию ЦПАО доставлены два флакона. Первый маркирован как «содержимое в/ч пазухи справа», содержит фрагменты соскобов ткани общими размерами 3×2,5×0,5 см. Второй флакон маркирован как «содержимое носовой полости справа»; во флаконе фрагменты серо-коричневой ткани общими размерами 5×3,5×0,5 см.

Гистологически опухоль имеет солидное строение с множественными прослойками соединительной ткани разной толщины, отдельными мелкими фокусами некроза и кровоизлияниями (рис. 1). Опухолевые клетки полигональной формы с небольшим количеством эозинофильной цитоплазмы, крупными гиперхромными ядрами преимущественно округлой формы с признаками умеренного ядерного полиморфизма, наблюдаются митотические фигуры – до трех в поле зрения (рис. 1, врезка). В прилежащей слизистой оболочке

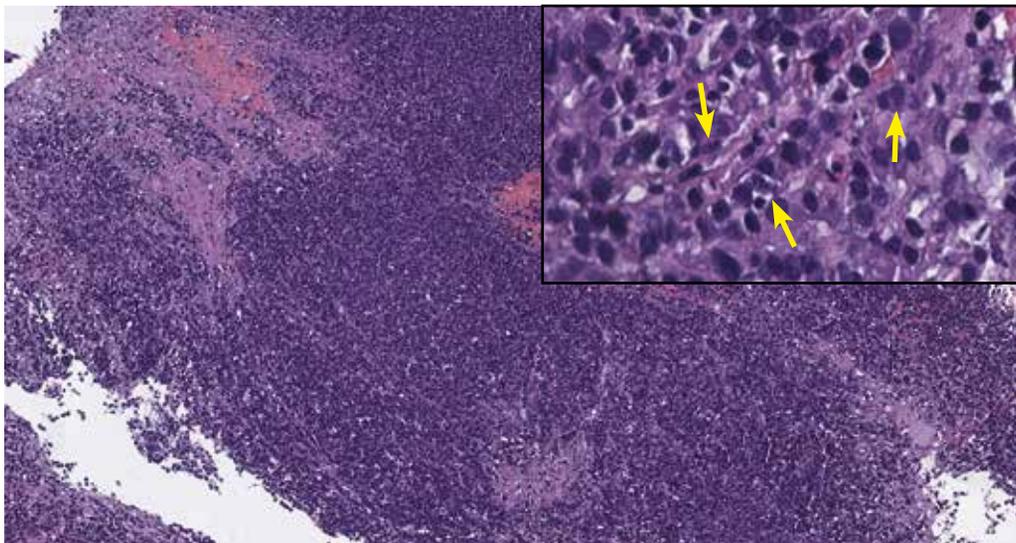


Рис. 1. Биоптат опухоли.

Основной рисунок – гистологическое строение ПЛЦ, ×100. Врезка – клеточный атипизм опухоли (стрелки), ×500.

Основной рисунок, врезка – световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином

Fig. 1. Tumor biopsy.

Main figure – histological structure of the PLC, ×100. Inset – cellular atypism of the tumor (arrows), ×500. Main figure,

inset – light microscopy, H&E stain

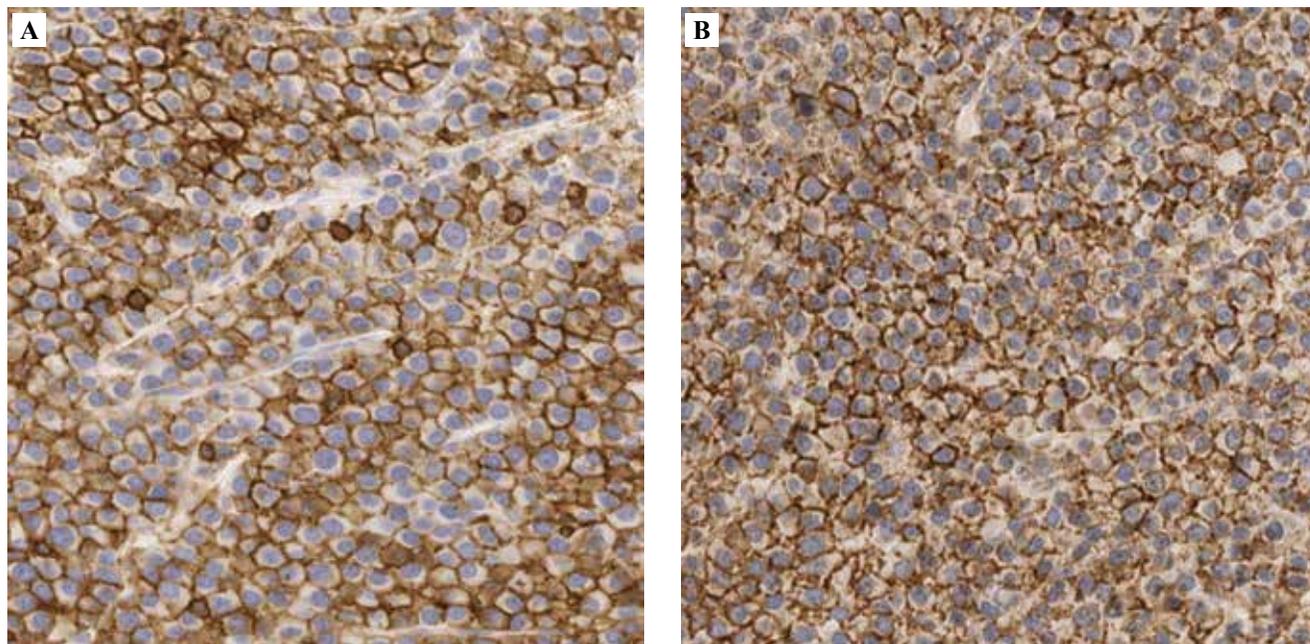


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование.

А – CD45: позитивная мембранная экспрессия в опухолевых клетках. В – CD138: позитивная мембранная экспрессия в опухолевых клетках. А, В – $\times 400$

Fig. 2. Immunohistochemistry.

А – CD45: positive membrane expression in tumor cells. В – CD138: positive membrane expression in tumor cells. А, В – $\times 400$

нёба рассеянная лимфоидная инфильтрация стромы, фрагменты костной ткани, нервные стволы.

Морфологическое исследование биоптатов не выявило в ткани опухоли специфических изменений, что не позволяло ее достоверно верифицировать. В связи с этим было проведено двухэтапное ИГХ исследование с целью исключения опухолей, имеющих сходную морфологическую картину. На первом этапе проводили ИГХ исследование с основными маркерами клеточных дифферонов для определения типа ткани: PanCK, Synaptophysin/Chromogranin A, Vimentin, CD45, NSE, S100, HMB-45, Melan-A. Выявлена положительная экспрессия CD45 – общий лейкоцитарный маркер (рис. 2 А). Экспрессии других исследованных маркеров в клетках опухоли не было. По результатам первого этапа диагностики было установлено, что опухоль имеет лимфоидное происхождение.

На втором этапе проводили дифференциальную диагностику между плазмоцитомой и экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомой с использованием характерных для лимфоидной ткани маркеров CD138, CD38, MUM1, CD79a, CD19, CD20. Наиболее выраженной оказалась положительная мембранная экспрессия CD138 – маркера плазматических клеток. Это позволило установить, что опухоль состоит из плазматических клеток (рис. 2 В). По результатам клинических и морфологических исследований поставлен диагноз «солитарная плазмоцитома верхней челюсти». Пациенту назначена лучевая терапия опухоли.

Обсуждение

В литературе опубликовано лишь несколько случаев ПЛЦ схожей локализации. Так, в статье М.Н. Xing et al. [6] было описано наблюдение опухоли у 70-летнего мужчины, которого на протяжении четырех месяцев беспокоили левосторонняя заложенность носа и выделения из носовых ходов кровавой слизи. При проведении КТ выявлено объемное образование левого синуса. С помощью гистологического и ИГХ исследований с маркерами CD138, CD20, CD45 поставлен диагноз «экстремедуллярная анапластическая плазмоцитома». В других трех случаях, представленных E. Cantone et al. в 2017 году [7], у пациентов также наблюдалась схожая клиническая картина, однако при гистологическом и ИГХ исследованиях была выявлена положительная экспрессия CD138 и поставлен диагноз «костная солитарная плазмоцитома». Эти наблюдения похожи на представленный нами случай своей характерной клинической картиной и аналогичными ИГХ маркерами, позволившими поставить диагноз. S. Chittamsetti et al. [8] представили клиническое наблюдение опухолевого образования в нижней челюсти справа у женщины 46 лет. Гистологическое исследование показало, что опухоль имела солидное строение, состояла из однородных клеток округлой и овальной формы с эксцентрично расположенным ядром, напоминающих плазматические клетки. Эти клетки были рассеяны на фоне многочисленных лимфоцитов в относительно редкой строме. Также наблюдались анапластические

клетки с гиперхромным ядром и редкими двуядерными формами, что указывало на злокачественность опухоли. При ее ИГХ исследовании с CD138, MUM1, CD45 выявлена положительная экспрессия всех маркеров, в связи с чем и был поставлен диагноз «солитарная плазмоцитома».

В отличие от предыдущих наблюдений G. Pantazidou [9] описал пациента 51 года с клинической картиной, сходной с таковой в нашем случае, и диагнозом «экстремедуллярная солитарная плазмоцитома носовой полости и носовых синусов с поражением костной ткани». При ИГХ исследовании у этого пациента в опухоли выявлены позитивные маркеры CD79a, CD138. Это говорит о том, что указанные ИГХ маркеры характеризуют именно солитарную плазмоцитома вне зависимости от ее локализации.

Как показывают приведенные наблюдения, ПЛЦ при одинаковой клинической и рентгенологической картине могут локализоваться как экстремедуллярно, так и внутрикостно, при этом их гистологическая картина может быть различной и неспецифичной, например с наличием или отсутствием очагов некроза, прослоек соединительной ткани, кровоизлияний, лимфоцитарного инфильтрата, в связи с чем при подозрении на ПЛЦ необходимо проводить ИГХ исследования с маркерами CD138, CD38, MUM1, CD79a, CD19, CD20. Возможно, различия гистологической картины ПЛЦ связаны с наличием определенных предрасполагающих факторов, особенно инфекционных. Например, в описанном T. Zhou et al. [10] случае гистологически подтвержденной анапластической плазмоцитомы носовых синусов у пациента имела место подтвержденная инфекция, вызванная вирусом Эпштейна–Барр, гистологическая картина была представлена пролиферацией гиперхромных плазматических клеток с множественными митозами и положительной экспрессией CD38, CD138, MUM1, CD56, Kappa, Bcl2. В описанном J. Nazarovs et al. [11] случае пациент с интракраниальной солитарной плазмоцитомой был положителен по ВИЧ-1 и COVID-19 инфекции. Гистологическая картина опухоли в этом случае характеризовалась наличием очагов некроза, пролиферацией плазматических клеток с явлениями плеоморфизма с прозрачной цитоплазмой и увеличенными ядрами. При ИГХ исследовании была отмечена положительная экспрессия CD138 и κ-легких цепей.

Заключение

Плазмоцитома – редкая злокачественная опухоль, имеющая разную локализацию и различную гистологическую картину, что создает определенные трудности в ее диагностике. Результаты стандартного лабораторного и гистологического анализов недостаточно для точного распознавания природы опухолевого процесса, и лишь иммуногистохимические методики позволяют дифференцировать плазмоцитома от других схожих опухолевых образований. Результаты нашего иссле-

дования, а также приведенные данные литературы позволяют утверждать, что установлению правильного диагноза «плазмоцитома» прежде всего способствует наличие в ее ткани CD138, MUM1, CD38 положительных маркеров. Тем не менее для дифференциальной диагностики плазмоцитомы среди лимфоидных опухолей также необходимо использовать CD79a, CD19 и CD20 маркеры. При этом надо учитывать, что на морфологическую картину опухоли, вероятно, могут влиять разные факторы, особенно инфекционные, что, однако, еще требует доказательств. Возможно, в нашем наблюдении отсутствие в анамнезе пациента указаний на перенесенные инфекционные заболевания повлияло на формирование у него гистологической картины опухоли, в частности на образование очагов некроза, прослоек соединительной ткани, кровоизлияний. На такую возможность указывают и некоторые цитируемые в статье авторы.

Следует заметить, что использованный нами алгоритм гистологического и иммуногистохимического исследований позволил поставить правильный диагноз этой сложной опухоли всего через 2 месяца после появления у пациента первых симптомов заболевания. Вероятно, этот фактор времени также имел значение в формировании гистологической картины плазмоцитомы в нашем наблюдении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein et al. (eds.). WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. V. 2. 4th ed. Lyon: IARC, 2017. 585 p.
2. Marotta S, Di Micco P. Solitary plasmacytoma of the jaw. *J Blood Med.* 2010;1:33–6. DOI: 10.2147/JBM.S8385.
3. Caers J, Paiva B, Zamagni E, Leleu X, Bladé J, Kristinsson SY et al. Diagnosis, treatment, and response assessment in solitary plasmacytoma: updated recommendations from a European Expert Panel. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):10. DOI: 10.1186/s13045-017-0549-1.
4. Гюева З.В., Вандышева Р.А., Епхивев А.А., Габуева А.А., Дзadzиева Н.Г., Ерофеева Л.М. и др. Клинико-морфологические особенности локального амилоидоза гортани. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2022;11(4):38–47. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.38-47.
Gioeva ZV, Vandyшева RA, Ephiev AA, Gabueva AA, Dzadzиеva NG, Erofeeva LM et al. Clinical and morphological features of localized laryngeal amyloidosis. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(4):38–47 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.38-47.
5. Nahi H, Genell A, Wälinder G, Uttervall K, Juliusson G, Karin F et al. Incidence, characteristics, and outcome of solitary plasmacytoma and plasma cell leukemia. Population-based data from the Swedish Myeloma Register. *Eur J Haematol.* 2017;99(3):216–22. DOI: 10.1111/ejh.12907.

6. Xing MH, Shaari AL, Beute JE, Mundi N, Matloob A, Khorsandi AS et al. Rare case of anaplastic plasmacytoma in the sinonasal tract. *Head Neck*. 2021;43(10):E46–50. DOI: 10.1002/hed.26818.
7. Cantone E, Di Lullo AM, Marano L, Guadagno E, Mansueto G, Capriglione P et al. Strategy for the treatment and follow-up of sinonasal solitary extramedullary plasmacytoma: a case series. *J Med Case Rep*. 2017;11(1):219. DOI: 10.1186/s13256-017-1382-4.
8. Chittemsetti S, Guttikonda VR, Sravya T, Manchikatl PK. Solitary plasmacytoma of mandible: a rare entity. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):136–9. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_175_18.
9. Pantazidou G, Papaioannou I, Karagkouni E, Fragkakis I, Korovessis P. Sinonasal extramedullary plasmacytoma with rare osteolytic lesions. *Cureus*. 2021;13(3):e14220. DOI: 10.7759/cureus.14220.
10. Zhou T, Tian Y, Cheng Q, Niu X, Sun H, Fan J et al. A rare case of Epstein-Barr virus-positive anaplastic plasmacytoma in the sinonasal tract. *Ear Nose Throat J*. 2022:1455613221104683. DOI: 10.1177/01455613221104683.
11. Nazarovs J, Lapse D, Stūre G, Soloveičika M, Jaunozolina L, Ozoliņa E et al. Intracerebral plasmacytoma in a patient with HIV-1 infection and SARS-CoV-2 superinfection. *Brain Sci*. 2022;12(6):705. DOI: 10.3390/brainsci12060705.

Информация об авторах

Игорь Дмитриевич Мусатов – ассистент Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Александр Сергеевич Занозин – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом ЦПАО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

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

Екатерина Денисовна Тетерина – студентка 4-го курса Института клинической медицины имени Н. В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

София Тариэловна Аврамова – доцент Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Николай Сергеевич Александров – доцент Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Вячеслав Семенович Пауков – доктор медицинских наук, профессор, почетный заведующий кафедрой патологической анатомии им. А.М. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Author information

Igor D. Musatov – Assistant, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-1640-5227>

Alexander S. Zanozin – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Central Pathology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-3254-3451>

Alexander S. Tertychnyy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology; Pathologist, Central Pathology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-5635-6100>

Ekaterina D. Teterina – 4th-year Student, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0009-0006-1200-1598>

Sofya T. Avraamova – Associate Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-9704-5915>

Nikolay S. Aleksandrov – Associate Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-2519-6420>

Vyacheslav S. Paukov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honorary Head of the A.M. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-6366-2851>

Всероссийская научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина»

All-Russian scientific conference with international participation “Current issues of normal and pathological morphogenesis. Regenerative biology and medicine”

15–16 ноября 2023 года в Москве на базе НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» состоялась Всероссийская научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина». Конференцию, ставшую уже традиционной, посетили и приняли в ней участие помимо москвичей ведущие специалисты – ученые и врачи – из разных городов страны, в частности из Санкт-Петербурга, Ростова-на-Дону, Челябинска и Новосибирска.

Программа конференции была насыщенной и включала 86 устных и стендовых докладов по следующим направлениям: клиническая морфология и патологическая анатомия заболеваний человека, экспериментальная морфология, регенеративная биология и медицина, актуальные вопросы репродукто-

логии. Красной нитью всех выступлений была тесная связь решения клинических проблем с исследованием фундаментальных основ жизнедеятельности человека. Вопросы репродуктивного здоровья вызвали живой интерес слушателей в свете повышенного внимания руководства страны к демографическим проблемам народонаселения. Тематика современной морфологической диагностики онкологических заболеваний и научно обоснованных подходов к их лечению была освещена с позиций персонализированной медицины с привлечением самых новейших современных высоких технологий. Неоднократно была затронута тема использования искусственного интеллекта и цифровизации гистологических препаратов, в частности был представлен проект, не имеющий аналогов в России и Европе, от лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына «Атлас пренатального развития мозга человека».

В рамках конференции прошел конкурс молодых ученых – на нем были представлены 28 научных докладов под руководством их старших наставников, что наглядно продемонстрировало преемственность поколений. Участники конкурса были отмечены поощре-





ниями руководства института. Первое место в конкурсе в номинации устных докладов по патологической анатомии заняла В.В. Печникова с сообщением «Имуногистохимические особенности воспалительных, предраковых и раковых поражений уротелия», а по клеточной биологии – Д.А. Артемова с сообщением «Экспериментальное лечение эндометриоза с помощью макрофагов».

Прошедшая конференция, как и в предыдущие годы, показала, что она является полезной площадкой для профессионального общения, обмена мнениями, демонстрации научных достижений и основных векторов научного развития. Важно, что представленные разработки специалистов-морфологов служат насущным потребностям клинической медицины и во

многом способствуют повышению качества медицинской помощи.

По итогам конференции опубликован в печатном и электронном виде сборник материалов, с которым можно ознакомиться на сайте НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» в разделе «Конференции» (ссылка <http://morfolhum.ru/news/48/>).

*Л.М. Михалева,
член-корреспондент РАН,
директор НИИ морфологии человека
им. акад. А.П. Авцына
ФГБНУ «РНЦХ
им. акад. Б.В. Петровского»*