

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2226-5988

№ 1 (25) / 2018

## «Клиническая и экспериментальная морфология»

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Выходит 4 раза в год

Основан в 2011 году

### Включен в перечень ВАК

Журнал представлен  
в информационной базе данных  
РИНЦ (Российский индекс  
научного цитирования)

### Учредитель

ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт морфологии человека»  
117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

### Адрес редакции

117418. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Телефон +7 (499) 120-43-03

e-mail: [sem.journal@mail.ru](mailto:sem.journal@mail.ru)

[www.morfolhum.ru](http://www.morfolhum.ru)

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

[www.mdv-group.ru](http://www.mdv-group.ru)

### Подписные индексы:

**70045** по каталогу агентства «Роспечать»

**70045** по каталогу «Урал-Пресс»

Свидетельство о регистрации средства

массовой информации

ПИ № ФС77-47183 от 2 ноября 2011 г.

© ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт морфологии человека»

## Главный редактор

член-корреспондент РАН, профессор *Л.В. Кактурский*

## Заместители главного редактора

профессор *О.В. Зайратьянц*

профессор *О.В. Макарова*

## Ответственный секретарь

Профессор *М.Н. Болтовская*

## Редакционная коллегия

Член-корр. РАН *В.В. Банин*

Д.б.н. *Г.Б. Большакова*

Д.м.н. *С.В. Буравков*

Профессор *А.М. Ковригина*

Профессор *И.А. Казанцева*

Профессор *И.И. Марков*

Профессор *А.П. Милованов*

Член-корр. РАН *Д.Б. Никитюк*

Профессор *Ю.Г. Пархоменко*

Профессор *В.С. Пауков*

Профессор *С.В. Савельев*

Профессор *А.Л. Черняев*

Профессор *В.В. Яглов*

Д.м.н. *Н.В. Яглова*

## Редакционный совет

Профессор *И.Н. Волощук*

Профессор *А.Е. Доросевич*

Профессор *Л.М. Ерофеева*

Д.б.н. *М.В. Кондашевская*

Профессор *А.В. Кононов*

Доктор медицины *М.Ю. Кочуков*

К.м.н. *В.Г. Кравцов*

Профессор *О.Д. Мишнев*

Профессор *Л.М. Михалева*

К.б.н. *В.А. Мхитаров*

Профессор *В.В. Новочадов*

Профессор *М.Г. Рыбакова*

Профессор *Н.М. Хмельницкая*

К.м.н. *В.П. Черников*

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.

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ  
CLINICAL MORPHOLOGY

- В.А. Цинзерлинг, А.А. Яковлев, М.В. Васильева,  
В.В. Зарубаев, С.А. Гладков, В.А. Дедов  
Морфологические изменения клеток,  
обусловленные разными штаммами вирусов  
гриппа А
- 4 V.A. Zinserling, A.A. Yakovlev, M.V. Vasilyeva,  
V.V. Zarubayev, S.A. Gladkov, V.A. Dedov  
Morphological changes of the cells due to different  
strains of influenza A virus
- Д.Е. Мацко, М.Ю. Мяснянкин,  
В.В. Анисимов, Г.И. Гафтон, А.О. Иванцов  
Морфологическая и иммуногистохимическая  
характеристика подногтевых меланом
- 12 D.E. Matsko, M.Y. Myasnyankin,  
V.V. Anisimov, G.I. Gafton, A.O. Ivantsov  
Morphologic and immunohistochemical characteristics  
of subungual melanoma
- В.Г. Бычков, С.Д. Лазарев, Е.Д. Хадиева,  
В.М. Золотухин, Д.В. Прокопов, И.В. Безусова  
Морфологические изменения билиарной системы  
при суперинвазионном описторхозе
- 19 V.G. Bychkov, S.D. Lazarev, E.D. Khadieva,  
V.M. Zolothukhin, D.V. Prokopov, I.V. Bezusova  
Morphological changes of the bilial system  
in superinvasive opisthorchiasis
- Д.А. Дьяконов, Н.С. Федоровская,  
В.А. Росин, Е.С. Фокина, Е.В. Трегубова  
Патоморфологические особенности костного  
мозга при JAK2-позитивной эссенциальной  
тромбоцитемии
- 25 D.A. Diakonov, N.S. Fedorovskaya, V.A. Rosin,  
E.S. Fokina, E.V. Tregubova  
Pathomorphological features of bone marrow  
in JAK2-positive essential thrombocytemia
- Б.Б. Бантыш  
Почечно-клеточная карцинома.  
Описание наблюдения
- 30 B.B. Bantysh  
Renal cell carcinoma. Case report
- А.С. Харламова, О.С. Годовалова  
Характеристика глиогенеза в препириформной  
коре человека в раннем фетальном онтогенезе
- 34 A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova  
Characteristics of gliogenesis in prepiriform cortex  
in early human fetuses

*Е.Л. Куренков, В.С. Рыкун, С.А. Гордеева*  
Морфометрия фибробластов  
теноновой капсулы при разных видах  
рефракции у детей

42 *E.L. Kurenkov, V.S. Rykun, S.A. Gordeeva*  
Morphometry of fibroblasts of the tenon capsule  
at different types of refraction in children

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

*А.В. Лохонина, А.С. Покусаев, И.В. Арутюнян,  
А.В. Ельчанинов, А.В. Макаров, И.З. Еремина,  
В.В. Суровцев, Г.Б. Большакова,  
Д.В. Гольдштейн, Т.Х. Фатхудинов*  
Характеристика иммунофенотипа  
резидентных макрофагов печени и профиля  
экспрессируемых генов

49 *A.V. Lokhonina, A.S. Pokusaev, I.V. Arutyunyan,  
A.V. Elchaninov, A.V. Makarov, I.Z. Eremina,  
V.V. Surovtsev, G.B. Bolshakova,  
D.V. Goldshtein, T.Kh. Fatkhudinov*  
Characteristics of the immunophenotype  
of the resident macrophages of the liver and profile  
of expressed genes

*А.Г. Бабаева, Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян,  
Е.С. Головнева, Д.А. Максаков*  
Регресс экспериментальной гиперплазии  
предстательной железы под действием  
лимфоцитарных и органных РНК

61 *A.G. Babaeva, N.V. Tishevskaya, N.M. Gevorkyan,  
E.S. Golovneva, D.A. Maksakov*  
Regression of experimental benign prostatic  
hyperplasia under the influence of rna from  
lymphocytes and organs

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

*М.В. Шамаракова, А.В. Асатурова,  
Л.С. Ежова, А.В. Козаченко*  
Многослойное муцинпродуцирующее  
интраэпителиальное поражение  
шейки матки

67 *M.V. Shamarakova, A.V. Asaturova,  
L.S. Ezhova, A.V. Kozachenko*  
Stratified mucin-producing intraepithelial lesion  
of the uterine cervix

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ РАЗНЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСОВ ГРИППА А

*В.А. Цинзерлинг<sup>1,2,3</sup>, А.А. Яковлев<sup>1,2</sup>, М.В. Васильева<sup>2</sup>,  
В.В. Зарубаев<sup>4</sup>, С.А. Гладков<sup>5</sup>, В.А. Дедов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>4</sup> ФГБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург

<sup>5</sup> ГБУЗ Архангельской области «Архангельская областная клиническая больница», Архангельск

В работе проведен анализ морфологических изменений, ассоциированных с непосредственным воздействием разных штаммов вируса гриппа А, начиная с 70-х годов XX века на клиническом и экспериментальном материале. Показана способность вируса как к цитопатическому, так и к цитопротрофиеративному эффекту. Выделены три основных типа изменений клеток респираторного эпителия на аутопсийном материале и варианты тканевых реакций. Описаны особенности микроскопических изменений при интраназальном заражении мышей.

*Ключевые слова:* вирусы гриппа А, цитопатические и цитопротрофиеративные изменения, экспериментальный грипп у мышей

Грипп относится к числу важнейших инфекций с высокой летальностью и известен уже в течение нескольких столетий. Вместе с тем патологическая анатомия гриппа в наиболее авторитетных мировых руководствах либо не приводится, либо описывается как неспецифическая. Даже посмертная диагностика гриппа в большинстве случаев основывается лишь на клинических, вирусологических и эпидемиологических данных. Предположительную диагностику гриппа на основании структурных изменений многие исследователи считают невозможной. В связи с этим все работы, посвященные патологической анатомии гриппа, приобретают особую ценность. Отдавая должное исследованиям В.Е. Пигаревского, Н.А. Максимович, Г.И. Ильина, В.Н. Парусова, нельзя не отметить, что наиболее весомый вклад в изучение патоморфологии гриппа внесли работы А.В. Цинзерлинга и его сотрудников [1, 3].

Исследованиями, преимущественно проведенными на клеточных культурах, показано, что вирусы гриппа размножаются в клетках цилиндрического эпителия и вызывают их дегенеративные изменения, используя содержимое клеток для построения новых вирусных частиц. Массированный выход зрелых вирусов в межклеточное пространство нередко сопровождается гибелью эпителиальных клеток. Вирусы гриппа

высвобождаются из клеток через их апикальные поверхности, что ограничивает распространение вируса во внутренние среды организма и определяет его преимущественный тропизм к эпителию респираторного тракта. В случае преимущественно вирусного поражения развивается серозная пневмония с вирусным поражением альвеолоцитов 1-го и 2-го типа [12, 15], а также альвеолярных макрофагов. Была подтверждена способность вируса гриппа к активной репликации в альвеолоцитах 2-го типа и слизистых железах [8, 12]. Для пораженных вирусом клеток характерны увеличение и интенсивное окрашивание цитоплазмы, увеличение ядер с появлением легко различимых ядрышек. Такие клетки описывали некоторые авторы [9], однако их диагностическое значение доказано лишь в работах А.В. Цинзерлинга [1, 3]. Следует отметить, что сходные изменения можно обнаружить и в клетках других органов – головного мозга, почек, кишечника [3, 17], и это, вероятно, указывает на возможность поражения вирусом клеток многих типов и развития при гриппе генерализованной инфекции, что коррелирует с клиническими проявлениями заболевания, прежде всего признаками поражения головного мозга и желудочно-кишечного тракта. Вместе с тем работ, посвященных внелегочным поражениям при гриппе, очень немного, а их механизмы остаются практически неизвестными.

Важное место в изучении патогенеза, патологической и особенно экспериментальной терапии гриппа принадлежит экспериментальным исследованиям и изучению естественного течения заболевания у разных животных. Первые экспериментальные исследования гриппа начались еще в 30-е годы XX века, вскоре после открытия вызывающих его вирусов. Существуют многочисленные исследования с заражением различными штаммами вируса гриппа свиней, хорьков и мышей. Гистопатологические изменения в дыхательной системе этих животных, а именно слущивание реснитчатого эпителия трахеи и бронхов и перибронхиальные воспалительные мононуклеарные инфильтраты, были оценены как сопоставимые с наблюдаемыми при гриппе у людей [4, 18]. В легких инфицированных свиней и хорьков развивались гиперемия и застой в капиллярах с мононуклеарной и нейтрофильной воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок (часто выраженной), некрозом и слущиванием клеток альвеолярного эпителия и интерстициальным и внутриальвеолярным отеком. Возможность формирования у мышей при интраназальном заражении вирусом гриппа смешанной инфекции, обусловленной «смыванием» микробиоты верхних дыхательных путей, показана в единственном экспериментальном исследовании А.В. Цинзерлинга [2]. В известных экспериментальных работах не описано образование гиалиновых мембран, а специальное внимание особенностям клеточных изменений инфицированных клеток не уделяется.

Задачей настоящего исследования был сравнительный морфологический анализ светооптических изменений чувствительных к вирусу гриппа клеток на аутопсийном и экспериментальном материале с учетом штаммов возбудителя.

## Материалы и методы

Нами ретроспективно проанализированы музейные микропрепараты из коллекции А.В. Цинзерлинга, относящиеся к летальным исходам от гриппа H3N2 детей и взрослых в 70-е годы XX столетия, и восемь наблюдений, относящихся к 2017 году.

Были изучены 15 наблюдений летальных исходов от гриппа А H1N1/California (Swine influenza) в 2009 году и 31 от того же серотипа вируса гриппа в 2016-м.

В 70-е годы диагноз базировался преимущественно на результатах серологического и иммунофлуоресцентного исследования, хотя в отдельных наблюдениях вирус выделялся на куриных эмбрионах.

Начиная с 2009 года диагноз ставили на основании RT-PCR. Во всех наблюдениях проводилось стандартное макроскопическое и детальное гистологическое исследование. В подавляющем большинстве наблюдений всех лет осуществлялось посмертное бактериологическое исследование легких, а при необходимости и других внутренних органов. Постоянно проводились клиничко-морфологические сопоставления.

Наряду с этим было проведено исследование экспериментального гриппа при интраназальном заражении беспородных белых мышей двумя штаммами вируса гриппа А H1N1/California: свежевыделенным, но адаптированным к мышам и хорошо изученным – WSN с известными нейротропными свойствами. Для эксперимента использовали самок белых беспородных мышей массой 14–16 граммов, которых получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская область) и содержали в виварии на стандартном рационе. Отбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животных наблюдали в течение 2 недель.

В эксперименте были использованы следующие группы: 15 мышей заражали интраназально вирусами гриппа А/California/07/09 (H1N1) и А/WSN (H1N1) в физиологическом растворе в дозах 1 и 10 LD<sub>50</sub>; пяти мышам интраназально вводили физиологический раствор; еще пять мышей служили отрицательным контролем.

Животных заражали вирусами гриппа А/California/07/09 (H1N1) и А/WSN (H1N1). Вирусы пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 часов при температуре 36°C.

Для определения инфекционного титра вируса гриппа в легочной ткани животных на третьи сутки после инфицирования, использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных панелях на среде MEM. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. Для гистологического исследования изготавливали и обрабатывали парафиновые срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином, а кроме того в некоторых наблюдениях реактивом Шиффа. На экспериментальном материале также проводили иммуногистохимическое исследование с помощью ослиных антител против антигенов вируса гриппа, предназначенных для работы с мышами.

## Результаты исследований

Характер морфологических изменений при гриппе в 70-е годы прошлого столетия был детально описан в работах А.В. Цинзерлинга и его сотрудников, в которых принимал участие и один из авторов настоящего исследования – В.А. Цинзерлинг. Дети чаще умирали от генерализованной вирусной инфекции с поражением легких, головного мозга и других органов [3]. Для взрослых наиболее характерными были деструктивные вирусно-бактериальные пневмонии [4]. Для вирусного поражения альвеолоцитов характерны расширение и интенсивное окрашивание цитоплазмы, а также увеличение ядер с более бледным их окрашиванием. Измененные таким образом клетки в работах А.В. Цинзерлинга названы гриппозными (рис. 1). На ранних стадиях заболевания в них содержится антиген вируса. В дальнейшем, по мере увеличения клеток в размерах,

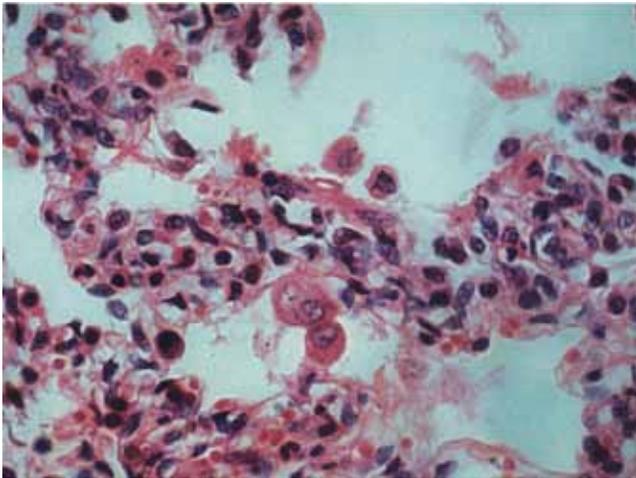


Рис. 1. Гриппозные клетки 1-го типа, типичные для гриппа А(Н3N2). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

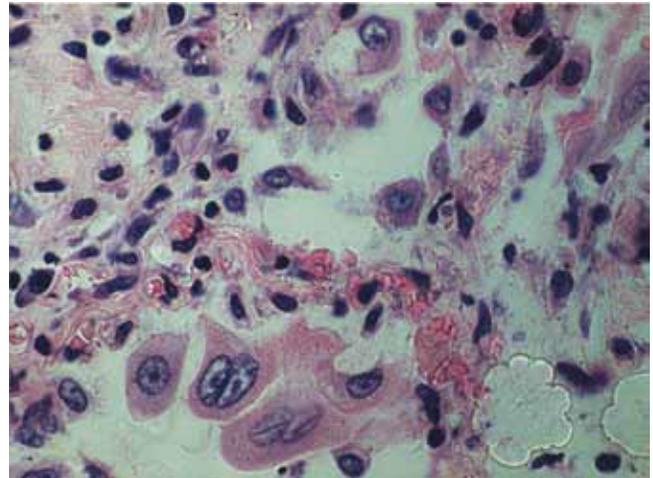


Рис. 2. Гриппозные клетки 2-го типа, типичные для гриппа А(Н1N1). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

они подвергаются лизису. Во всех наблюдениях в качестве наиболее важных для морфологической диагностики рассматривались гриппозные клетки, которые в последнее время стали обозначать как 1-го типа. В рамках исследований последних лет нами была проведена их морфометрическая оценка.

При анализе восьми летальных исходов от гриппа А (Н3N2) в 2017 году выявленные вирусобусловленные изменения соответствовали наблюдавшимся в 70-е годы XX века.

В наших исследованиях в ткани легких умерших от гриппа, вызванного вирусом California/2009 (H1N1), на разных сроках заболевания обнаруживались также эпителиальные клетки и макрофаги большего размера, чем описанные ранее, с увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением, часто с двумя и более ядрами с отчетливыми ядрышками, не имевшие склонности к лизису. Такие клетки условно названы гриппозными клетками 2-го типа (рис. 2). Вызванные вирусом цитопатические изменения сохранялись дольше, чем описывалось ранее. Так, если раньше они наблюдались лишь на первой неделе заболевания, а морфологические проявления гриппа начиная с 11-х суток болезни рассматривали как постгриппозную стадию, то на секционном материале последних лет характерные вирусиндуцированные изменения можно было наблюдать даже на третьей неделе болезни.

Из таблицы видно, что описанные в данной работе гриппозные клетки 2-го типа, характерные для гриппа H1N1 Калифорния, крупнее ( $p \leq 0,05$ ) гриппозных клеток, описанных А.В. Цинзерлингом, и отличаются от них большим ядерно-цитоплазматическим коэффициентом ( $p \leq 0,05$ ).

Наличие распространенных деструктивных изменений в респираторных отделах с коллапсом альвеол, образованием гиалиновых мембран вдоль стенок альвеол

Таблица

Площади и ядерно-цитоплазматические коэффициенты гриппозных клеток 1-го и 2-го типа ( $n=50, p < 0,05$ )

	Гриппозные клетки 1-го типа	Гриппозные клетки 2-го типа
Площадь (условные единицы)	14273,6 $\pm$ 1099,8	19715,3 $\pm$ 1436,4
Ядерно-цитоплазматический коэффициент	0,274 $\pm$ 0,014	0,347 $\pm$ 0,016

и альвеолярных ходов, а также фибриновых тромбов в сосудах мелкого калибра свидетельствует о диффузном альвеолярном повреждении (ДАП), являющемся почти постоянной находкой в летальных случаях гриппа при пандемии 2009/2010 года [4–16]. Клинически ДАП проявлялось респираторным дистресс-синдромом с развитием тяжелой дыхательной недостаточности, которая служила непосредственной причиной смерти в этих случаях. Подтверждением того, что ДАП является именно проявлением гриппа, как описано при пандемиях 1918 и 1957 годов, а не вторично по отношению к длительной искусственной вентиляции легких (ИВЛ), служит большое число наблюдений ДАП при гриппе у умерших вне стационара.

Наши наблюдения подтвердили, что один из ведущих патоморфологических признаков крайне тяжелого гриппа в настоящее время – острое легочное повреждение, клинически проявляющееся острым респираторным дистресс-синдромом и служащее

причиной гипоксемии, рефрактерной к оксигенотерапии и ИВЛ. Характерно, что ни у кого из умерших с морфологической картиной острой фазы ДАП (14 человек) не имелось значимой бактериальной коинфекции легких, но она встречалась при той же продолжительности болезни у некоторых умерших с чертами только серозно-десквамативной пневмонии. Ведущим механизмом развития ДАП при гриппе является прямое поражение вирусом альвеолоцитов 1-го, 2-го типа и эндотелия, что подтверждается выявлением в этих клетках вирусного антигена, а также опосредованное повреждение альвеолокапиллярного барьера через воспалительный ответ хозяина (гиперпродукция цитокинов острой фазы), поэтому вполне логично предположить, что в условиях «цитокиновой бури» размножение бактерий в легких затруднено. Вследствие этого еще одной вероятной причиной относительной редкости бактериальной наслойки в настоящее время следует считать более частое развитие ДАП при тяжелом гриппе.

Гриппозные клетки обоих типов прослежены вплоть до 28-х суток от начала заболевания, также максимально на 28-е сутки на секционном материале методом ОТ-ПЦР был выявлен антиген вируса. Это значительно (больше чем в 2 раза) превышает сроки выявления вируса и вирусиндуцированных изменений по опыту предыдущих эпидемий.

Постоянно гриппозные клетки выявлялись и были наиболее многочисленны в случаях смерти в первые 2 недели от начала заболевания. Вирусобусловленные изменения клеток легочных альвеол не обнаружены в восьми случаях: 1) у пациентов, которым лечение озельтамивиром начато в первые 2 суток от начала заболевания, 2) у умерших с массивной бактериальной коинфекцией легких.

Характер цитопатических и особенно цитопролиферативных изменений в дыхательных путях у умерших в случаях посмертной или прижизненной лабораторной верификации гриппа был сходен с изменениями, выявляемыми у умерших с неидентифицированным возбудителем. При иммуногистохимическом исследовании нуклеопротеин вируса гриппа выявлен в эпителиальных клетках исключительно с признаками цитопатических изменений, в том числе цитопролиферативных, что подтверждает вирусобусловленное происхождение описанной трансформации клеток.

Особую диагностическую значимость цитопролиферативные изменения в эпителии бронхов имели в тех случаях, когда гриппозные клетки в альвеолах не выявлялись, что отмечено у умерших с массивной бактериальной коинфекцией легких, когда морфологическая картина пневмонии не сохраняла черты вирусного поражения.

В нашем исследовании в секционных наблюдениях, подозрительных на грипп, но не имевших лабораторного подтверждения, нуклеопротеин вируса был выявлен с помощью ИГХ анализа в клетках бронхи-

ального и альвеолярного эпителия с пролиферативными изменениями при наибольшем сроке заболевания 22 дня. Это свидетельствует, во-первых, о возможности более длительной персистенции вируса в эпителиальных клетках, а во-вторых, о существовании именно вирусобусловленных цитопролиферативных изменений эпителия.

Проникновению патогенной микробиоты в респираторные отделы легких при гриппе способствует обычно протяженная десквамация эпителиальной выстилки дыхательных путей, вызванная цитолитическим действием вируса, поэтому относительная редкость присоединения бактериальной пневмонии при современном гриппе, по сравнению с наблюдениями прежних лет, могла быть также частично обусловлена меньшей выраженностью цитолитического эффекта.

При анализе секционного материала умерших в 2016 году от гриппа А(Н1N1)pdm09, верифицированного по эпидемиологическим, клиническим, молекулярно-биологическим и морфологическим данным, отдельные наблюдения отличались от описанных ранее в литературе и встречавшихся в собственной многолетней практике.

При микроскопическом исследовании отмечено резкое преобладание вирусиндуцированных изменений, проявления диффузного альвеолярного повреждения и бактериальной наслойки были выражены минимально. Особый интерес представили ранее не описанные в литературе и не наблюдавшиеся нами изменения клеток альвеолярного эпителия и макрофагов. Многие из них были резко увеличены в размерах (до 10 раз по сравнению с исходными) (рис. 3), другие образовывали гигантские многоядерные клетки, существенно отличающиеся от классических форм (клетки Лангханса и инородных тел) (рис. 4).

Внимание также привлекла выявленная в другом наблюдении при микроскопическом исследовании

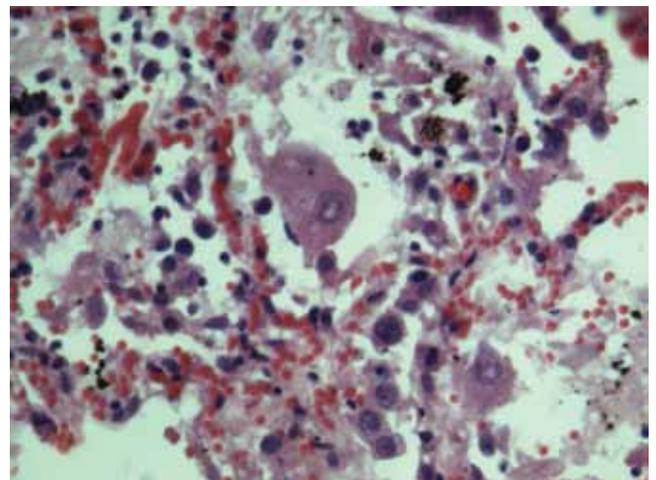


Рис. 3. Гриппозные клетки 3-го типа, появившиеся при гриппе А(Н1N1) в 2016 году. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

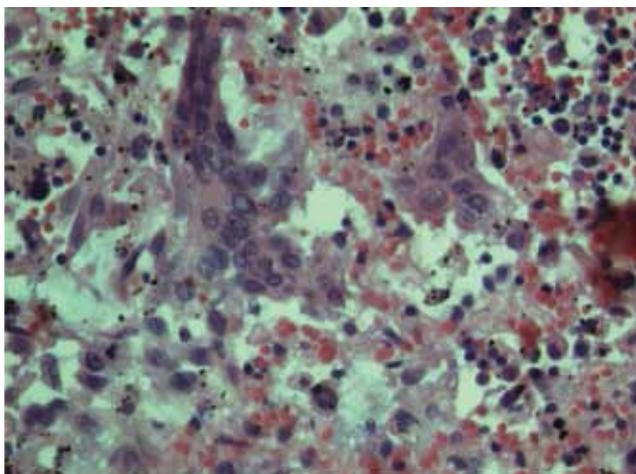


Рис. 4. Гигантские многоядерные клетки, появившиеся при гриппе А(H1N1) в 2016 году. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

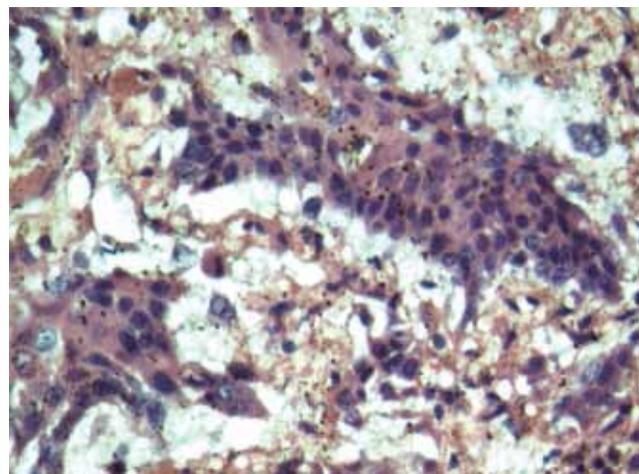


Рис. 5. Участки плоскоклеточной метаплазии, появившиеся при гриппе А(H1N1) в 2016 году. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

плоскоклеточная метаплазия альвеолярного эпителия (рис. 5). Условно данные изменения можно обозначить как гриппозные клетки 3-го типа.

#### Результаты экспериментального исследования

Репликация вирусов гриппа обоих типов была максимальной на 3-и сутки после инфицирования (California –  $6,20 \pm 0,18$ ; WSN –  $6,10 \pm 0,26$ ) с ее постепенным снижением на 7-е и 14-е сутки. Следует отметить, что на 14-е сутки средние показатели репликации вируса гриппа А/California ( $1,30 \pm 0,30$ ) более чем в 2 раза превышают соответствующие показатели А/WSN ( $0,60 \pm 0,22$ ).

Площадь безвоздушных очагов, соответствующих при микроскопическом исследовании очагам преимущественно вирусной пневмонии со смешанно-клеточным экссудатом и увеличенным перибронхиальным лимфатическим фолликулам, была максимальной на 7-е и 14-е сутки после инфицирования, достоверно превышая аналогичные показатели контрольных животных. Эти очаги связаны не только с островоспалительной инфильтрацией, обусловленной репликацией вируса гриппа, но и с пролиферативными изменениями со стороны разных клеток, в том числе лимфоидных.

При морфологическом исследовании на 3-и сутки после заражения обоими штаммами определялись отчетливые воспалительные изменения прежде всего в виде бронхита с появлением в просвете бронхов нейтрофильного экссудата с большим количеством распадающихся клеток (рис. 6). Точная природа таких изменений остается не вполне ясной. Нельзя исключить, что у мышей само заражение вирусом гриппа на ранних сроках может вызвать нейтрофильную инфильтрацию. Другим, более вероятным объяснением является активация собственной микробиоты верхних дыхательных путей, которая при заражении была смы-

та в респираторные отделы. Необходимо упомянуть, что у мышей контрольной группы, которым интраназально закапывали в тех же объемах, что и мышам опытных групп, чистый физиологический раствор, таких изменений практически не было. При ИГХ исследовании, направленном на поиски антигена вируса гриппа А с ослиной сывороткой, рекомендованной для работы с экспериментальными мышами, искомым антиген определялся в зоне описанной инфильтрации в небольшом числе клеток. При гистобактериоскопических исследованиях с окраской препаратов по методу Романовского на этих участках определялись мелкие кокки, что позволяет ориентировочно считать, что такие поражения имеют вирусно-бактериальную природу.

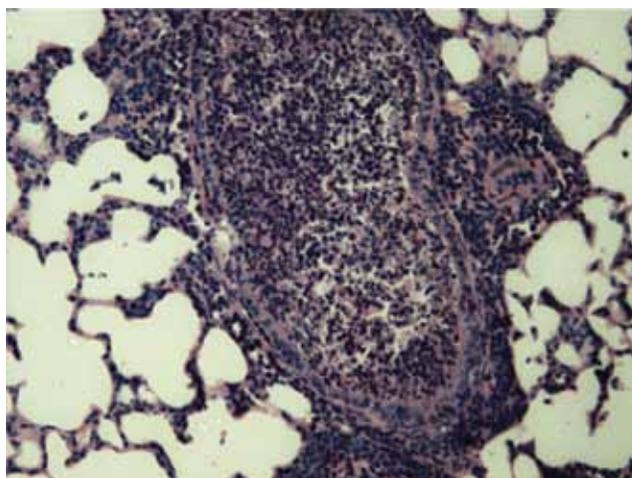


Рис. 6. Гнойный бронхит и перибронхит на 3-и сутки после заражения мыши вирусом гриппа. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 320$

Площадь воспалительной инфильтрации, определенная по процентному соотношению безвоздушной ткани к площади среза, в целом коррелировала с динамикой результатов вирусологического исследования, но без тенденции к уменьшению на 14-е сутки, что может быть связано с большей выраженностью процессов, обусловленных присоединением вторичной микрофлоры, и местными иммуноморфологическими реакциями, приведшими к увеличению площади, занимаемой перибронхиальными скоплениями лимфоидной ткани.

Клетки бронхиального эпителия, альвеолоциты, альвеолярные макрофаги, эндотелиоциты содержали антиген вируса и претерпевали структурные изменения, сходные с описанными на аутопсийном материале у человека, правда выраженные в меньшей степени (рис. 7). Изменений, сопоставимых с проявлениями диффузного альвеолярного повреждения у умерших больных, не было ни у одного, даже павшего животного.

### Заключение

Приведенные данные подтверждают, что вирусы гриппа вызывают характерные изменения чувствительных клеток, позволяющие предположительно ставить этот диагноз уже при рутинном гистологическом исследовании. Разные штаммы вызывают несколько отличающиеся изменения, которые могут быть обозначены как гриппозные клетки 1-го, 2-го и 3-го типа. В одних случаях преобладает более выраженный цитопатический эффект, а в других – цитопротрофический. Можно предполагать, что эти различия связаны с генетическим полиморфизмом циркулирующих в разные годы штаммов, однако необходимый молекулярно-биологический анализ никто не проводил. Такого рода изменения могут наблюдаться как в органах дыхания, так и со стороны эндотелия сосудов,

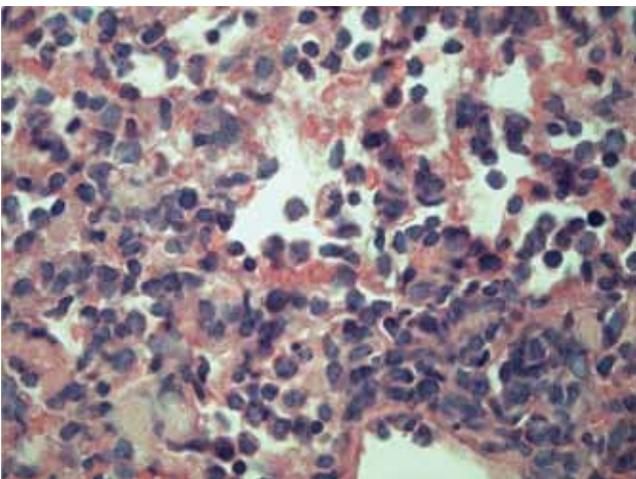


Рис. 7. Воспалительные изменения в легком на 7-и сутки после заражения мыши вирусом гриппа. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 640$

мягких мозговых оболочек и других органов. Следует отметить, что даже один пандемический штамм гриппа A/California/07/09 (H1N1) способен в разные годы вызывать различные изменения чувствительных клеток. Для эпидемического штамма свиного гриппа характерен тяжелый респираторный дистресс-синдром, ведущим проявлением которого является наличие гиалиновых мембран. Наиболее вероятно, что их формирование связано с цитокиновым дисбалансом на фоне поражения вирусом гриппа альвеолярных макрофагов. Бактериальная наслойка ведет к формированию гнойного воспаления, степень выраженности которого на фоне респираторного дистресс-синдрома чаще всего минимальна.

Самая распространенная экспериментальная модель гриппа при интраназальном заражении белых мышей позволяет оценивать цитопатический эффект различных штаммов вирусов гриппа и судить об его генерализации, хотя типичные изменения клеток выражены слабее, чем у человека. Во многих случаях при использовании беспородных белых мышей в легких формируются смешанные вирусно-бактериально-микоплазменные ассоциации. Изменений, сходных с респираторным дистресс-синдромом у человека, при экспериментальном заражении мышей вирусом гриппа не возникает.

Многие вопросы пато- и морфогенеза гриппа нуждаются в дальнейшем изучении на клиническом и экспериментальном материале.

### Литература

1. Цинзерлинг А.В. Этиология и патологическая анатомия острых респираторных инфекций. Л.: Медицина, 1977. 160 с. [Tsinzerling A.V. Etiologiya i patologicheskaya anatomiya ostryh respiratornyh infekciy. L.: Medicina, 1977. 160 s. (In Russ.)].
2. Цинзерлинг А.В., Солдатова В.М., Платонов В.Г. Сущность метагриппозной стадии гриппа // Архив патологии. 1980. № 3. С. 46–50. [Tsinzerling A.V., Soldatova V.M., Platonov V.G. Sushhnost metagrippoznoy stadii grippa // Arhiv patologii. 1980. V. 3. S. 46–50. (In Russ.)].
3. Цинзерлинг А.В., Цинзерлинг В.А. Современные инфекции: патологическая анатомия и вопросы патогенеза: Руководство. 2-е изд. исправл. и доп. СПб.: Сотис, 2002. 346 с. [Tsinzerling A.V., Tsinzerling V.A. Sovremennye infekcii: patologicheskaya anatomiya i voprosy patogeneza: Rukovodstvo. 2 izd., ispravl. i dop. SPb.: Sotis, 2002. 346 s. (In Russ.)].
4. Цинзерлинг В.А. Патоморфология. В кн.: Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика: Руководство для врачей / Ред. О.И. Киселев, Л.М. Цыбалова, В.И. Покровский. М.: Издательство МИА, 2012. С. 283–314. [Tsinzerling V.A. Patomorfologiya. V kn.: Gripp: epidemiologiya, diagnostika, lechenie, profilaktika: Rukovodstvo dlya vrachey / Red. O.I. Kiselev, L.M. Cybalova, V.I. Pokrovskiy. M.: Izdatelstvo MIA, 2012. S. 283–314. (In Russ.)].
5. Цинзерлинг В.А., Васильева М.В., Эсауленко Е.В., Яковлев А.А., Григорьева И.В. Анализ летальных исходов при

- гриппе А/Н1N1pdm09 в эпидемический сезон 2015/2016 года // Инфекционные болезни. 2016. Т. 14, № 4. С. 81–84. [Tsinzerling V.A., Vasileva M.V., Esaulenko E.V., Yakovlev A.A., Grigoreva I.V. Analiz letalnih ishodov pri griппe A/H1N1pdm09 v epidemicheskiy sezon 2015/2016 goda // Infekcionnye bolezni. 2016. V. 14, No 4. S. 81–84. (In Russ.)].
6. Цинзерлинг В.А., Воробьев С.Л., Зарубаев В.В., Беляевская С.В., Эсауленко Е.В., Григорьева И.В., Дедов В.А., Грудинин М.П., Бузицкая Ж.В., Писарева М.М., Прочуханова А.Р., Стукова М.А., Азаренок А.А., Жилинская И.Н. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом H1N1v в 2009/2010 году, по аутопсии // Архив патологии. 2011. № 6. С. 21–25. [Tsinzerling V.A., Vorobev S.L., Zarubaev V.V., Belyaevskaya S.V., Esaulenko E.V., Grigoreva I.V., Dedov V.A., Grudinin M.P., Buzitskaya Zh.V., Pisareva M.M., Prochuhanova A.R., Stukova M.A., Azarenok A.A., Zhilinskaya I.N. Patogeneticheskie aspekty griппa v period epidemii, vyzvannoy virusom H1N1v v 2009/2010 godu po autopsii // Arhiv patologii. 2011/ V. 6. S. 21–25. (In Russ.)].
  7. Черняев А.Л., Зайратьянц О.В., Поляно Н.И., Келли Е.И., Рогов К.А., Михалева Л.М., Чарторижская Н.Н., Трусов А.Е., Самсонова М.В., Чучалин А.Г. Патологическая анатомия гриппа А/Н1N1 // Архив патологии. 2010. № 3. С. 3–6. [Chernyaev A.L., Zayratyants O.V., Polyanko N.I., Kelli E.I., Rogov K.A., Mihaleva L.M., Chartorizhskaya N.N., Trusov A.E., Samsonova M.V., Chuchalin A.G. Patologicheskaya anatomiya griппa A/H1N1 // Arhiv patologii. 2010. V. 3. S. 3–6. (In Russ.)].
  8. Bhatnagar J., Jones T., Blau D.M. et al. Localization of pandemic 2009 H1N1 Influenza A virus RNA in lung and lymph nodes of fatal influenza cases by situ hybridization: new insights on virus replication and pathogenesis // J Clin Virol. 2013;56(3):232–7. doi 10.1016/j.jcv.11.014.
  9. Capelozzi V.L., Parra E.R., Ximenes M. et al. Pathological and ultrastructural analysis of surgical lung biopsies in patients with swine-origin influenza type A/H1N1 and acute respiratory failure // Clinics. 2010;65(12):1229–37.
  10. Gill J.R., Sheng Z.-M., Ely S.F., Guinee D.G. Jr. et al. Pulmonary Pathologic Findings of Fatal 2009 Pandemic Influenza A/H1N1 Viral Infections // Arch Pathol Lab Med. 2010;134:235–43.
  11. Mauad T., Hajjar L.A., Callegari G.D. et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection // Am J Respir Crit Care Med. 2010;181(1):72–9.
  12. Nakajima N., Hata S., Sato Y. et al. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination // Jpn J Infect. Dis. 2010;63:67–71.
  13. Rosen D.G., Lopez A.E., Anzalone M.L. et al. Postmortem findings in eight cases of influenza A/H1N1 // Modern Pathology. 2010;23:1449–57.
  14. Shieh W.J., Blau D.M., Denison A.M. et al. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States // Am J Pathol. 2010;177(1):166–75.
  15. Soto-Abraham M.V., Soriano-Rosas J., Diaz-Quiñonez A. et al. Pathological changes associated with the 2009 H1N1 virus // N Engl J Med. 2009;361(20):2001–3.
  16. Sullivan S.J., Jacobson R.M., Dowdle W.R., Poland G.A. 2009 H1N1 Influenza // Mayo Clin Proc. 2010;85(1):64–76.
  17. Zinserling A.V., Aksenov O.A., Melnikova V.F., Zinserling V.A. Extrapulmonary lesions in influenza // Tohoku J Exp. 1983;140:259–72.
  18. Zinserling V.A., Dedov V.A. Influenza. In: Infectious Disease and Parasites. Springer Encyclopedia of Pathology / Ed. by P. Hofman. Switzerland: Springer, 2016. P. 179–82.

## MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE CELLS DUE TO DIFFERENT STRAINS OF INFLUENZA A VIRUS

V.A. Zinserling, A.A. Yakovlev, M.V. Vasilyeva, V.V. Zarubayev, S.A. Gladkov, V.A. Dedov

In the paper are analyzed the morphological changes associated with direct impact of different strains of influenza A viruses since 70<sup>th</sup> of XX century on clinical and experimental material. Demonstrated the ability of virus to cytopathic and cytoproliferative effects. Are evaluated 3 main types of changes of the respiratory epithelium cells on autopsy material and variants of tissue reactions. Are described the peculiarities of microscopical changes after intranasal challenge of mice.

**Key words:** influenza A viruses, cytopathic and cytoproliferative changes, experimental influenza in mice

### Информация об авторах

Цинзерлинг Всеволод Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом патоморфологии НМИЦ им. В.А. Алмазова, руководитель центра инфекционной патологии клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина, профессор кафедры патологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета. Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2. Телефон 8 921 320-3442. E-mail: zinserling@yandex.ru

Яковлев Алексей Авенирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней Санкт-Петербургского университета, главный врач клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина. Адрес: 191167, Санкт-Петербург, ул. Миргородская, д. 3. Телефон 8 (812) 717 2848. E-mail: kibbotkin@mail.ru

Васильева Марина Владимировна – врач-патологоанатом клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина.  
Адрес: 191167, Санкт-Петербург, ул. Миргородская, д. 3. Телефон 8 (812) 717 2848. E-mail: kibbotkin@mail.ru

Зарубаев Владимир Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14. Телефон 8 (812) 233 2092. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Гладков Сергей Анатольевич – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения Архангельской областной клинической больницы.

Адрес: 163045, Архангельск, проспект Ломоносова, д. 292. Телефон 8 (8182) 63 63 63 E-mail: info@aokb.ru

Дедов Владимир Андреевич – аспирант кафедры патологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9. Телефон 8 (812) 328 2020. E-mail: spbu@spbu.ru

*Материал поступил в редакцию 1 октября 2017 года*

# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДНОГТЕВЫХ МЕЛАНОМ

**Д.Е. Мацко**<sup>1, 2</sup>, **М.Ю. Мяснянкин**<sup>3</sup>, **В.В. Анисимов**<sup>3</sup>, **Г.И. Гафтон**<sup>3</sup>, **А.О. Иванцов**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Санкт-Петербургский научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Целью настоящей работы явилось исследование морфологических и иммуногистохимических особенностей подногтевых меланом, а также их влияние на прогноз заболевания. Исследовано 40 меланом с морфологически подтвержденным диагнозом «подногтевая меланома». По результатам анализа установлено, что по патоморфологической картине и иммуногистохимическому профилю подногтевые меланомы чрезвычайно гетерогенны. Выявлены основные морфологические факторы, статистически достоверно влияющие на прогноз заболевания: уровень инвазии опухоли по Кларку, изъязвление эпителия, поражение опухолью кости фаланги. В девяти случаях (25,7%) имело место цитоплазматическое окрашивание антителом С-kit (CD117). Экспрессия С-kit в клетках подногтевых меланом позволяет рассматривать их как мишень для ингибиторов С-kit (иматиниб).

*Ключевые слова:* подногтевая меланома, морфологические особенности, С-kit, факторы прогноза

Меланома является одной из наиболее агрессивных злокачественных опухолей кожи. В структуре всех онкологических заболеваний на эту опухоль приходится около 5% [1, 5]. По данным ВОЗ, каждый год в мире от меланомы умирает около 48 000 человек и отмечается рост заболеваемости. Меланома кожи – опухоль визуальной локализации, но более чем у трети пациентов она выявляется уже при наличии метастазов [1, 6]. Акрально-лентигинозная меланома кожи – одна из разновидностей клинико-морфологических типов меланомы. Она возникает на коже пальцев, межпальцевых промежутков, подошв, ладоней, ногтевого ложа и характеризуется определенными клиническими и морфологическими особенностями, отличающимися от меланомы кожи других клинико-морфологических форм [2, 5, 8]. Наиболее частой формой акрально-лентигинозной меланомы у лиц белой расы является подногтевая меланома (ПМ) [2, 5]. Чаще всего фактором риска развития ПМ становится не инсоляция, а различные хронические раздражители, температурные и механические травмы, хирургические вмешательства при заболеваниях ногтей. Диагноз «подногтевая меланома» на поздних стадиях устанавливается без особого труда. Диагностика на ранних стадиях весьма затруднена. Подногтевую меланому в большинстве случаев необходимо дифференцировать с грибковым

поражением ногтевого ложа (онихомикоз), панарицием, подногтевой и подэпидермальной гематомой, бородавкой, кавернозной тромбированной гемангиомой, невусом [2, 4]. По данным литературы, имеют место определенные трудности ранней диагностики ПМ, учитывая многообразие различных патологических процессов в данной области [2, 4].

По данным доступной нам литературы, в России патоморфологические особенности ПМ практически не изучались, а за рубежом представлены ограниченным числом публикаций [4, 5, 8].

Целью настоящей работы было исследование морфологических и иммуногистохимических особенностей подногтевых меланом, а также их влияние на прогноз заболевания.

## Материалы и методы

В настоящем исследовании проанализирована база данных НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, включающая информацию о 2500 пациентов со злокачественной меланомой кожи, проходивших лечение в период с 1991 по 2015 год. Исследован архивный материал лаборатории патологической анатомии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Выявлено 40 радикально прооперированных пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом «подногтевая меланома».

Средний возраст пациентов с ПМ на момент установления диагноза составил  $66 \pm 1,6$  года (максимальное и минимальное значения равняются 90 и 40 годам, соответственно), среди женщин этот показатель равнялся  $67 \pm 1$  года, у мужчин –  $64 \pm 3$  года.

В анализируемой группе пациентов было 30 женщин (75%) и 10 мужчин (25%), соотношение 3:1. Наибольшее число пациентов с ПМ отмечалось в интервале старше 70 лет ( $n=19$ ). По этнической принадлежности больные (100%) относились к европеоидной расе.

В структуре поражения пальцев стоп и кистей преобладают большие пальцы, 21 (52,5%) и восемь (20,0%), соответственно (рис. 1).

Стадирование опухолевого процесса проводилось согласно 7-му изданию Руководства по стадированию злокачественных новообразований Объединенного американского комитета по раку (American Joint Committee on Cancer, AJCC, 2009) [3].

Морфологическое изучение материала проводили в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей кожи ВОЗ 2006 года. В каждой опухоли были оценены следующие признаки: гистологический тип меланомы, морфология клеток, изъязвление эпидермиса, наличие пигмента, уровень инвазии по Кларку, толщина опухоли по Бреслоу, митотическая активность с учетом феномена созревания, наличие лимфоидного инфильтрата и степень его выраженности, наличие или отсутствие признаков спонтанной регрессии опухоли.

Морфологическое исследование проведено на срезах толщиной 3–5 мкм с окраской гематоксилином и эозином с целью обзорной гистологической характеристики.

Иммуногистохимическое исследование с использованием панели маркеров (перечень антител приведен в табл. 1) проводили по общепринятой методике на депарафинизированных срезах толщиной 3–4 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах согласно протоколам фирм-производителей, прилагае-



Рис. 1. Число случаев подногтевой меланомы на пальцах рук и ног

Таблица 1

Характеристика антител, применявшихся в исследовании

Антитело	Клон	Разведение	Производитель
BRAF V600E	VE1	1:100	BOX Spring
C-kit (CD117)	SP26	1:100	DAKO
S-100 protein	Poly	1:400	Genemed
PD-1	NAT 105	1:10	Cell Marque
PD-L1	Poly	1:1000	Genetex
Melanosome	HMB45	1:100	Genemed
ALK	D5F3	1:75	PrimeBioMed
Tyrosinase	T311	1:100	Leica Biosystems
Ki-67	SP6	1:1000	Cell Marque
MelanA	A103	1:100	Genemed
Phospho-Histone H3	Poly	RTU	Cell Marque

мым к используемым моно- и поликлональным антителам [7, 8]. Интенсивность иммунного окрашивания оценивали визуально и характеризовали как отсутствие реакции, слабая, умеренно выраженная и выраженная экспрессия [7]. Количество опухолевых клеток, экспрессирующих антиген, оценивали полуколичественно: 0 – нет окрашивания, 1+ – окрашивание <5% клеток, 2+ – окрашивание 5–25% опухолевых клеток, 3+ – окрашивание 26–50% клеток, 4+ – окрашивание >50% клеток [7].

Для статистической обработки все данные о пациентах и результатах лечения, клинико-морфологических методов исследования формализованы с помощью кодификатора и внесены в базу, созданную на основе электронных таблиц Excel. Для статистической обработки данных использовался пакет программ IBM SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences software program v. 19.0).

Для определения наиболее значимых независимых факторов, влияющих на отдаленные результаты лечения, использованы методы однофакторного (Log-rank test) и многофакторного анализа регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса. При нормальном распределении выборок для определения достоверности различий между ними был применен параметрический t-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании всех 40 удаленных операционных препаратов ПМ установлено, что

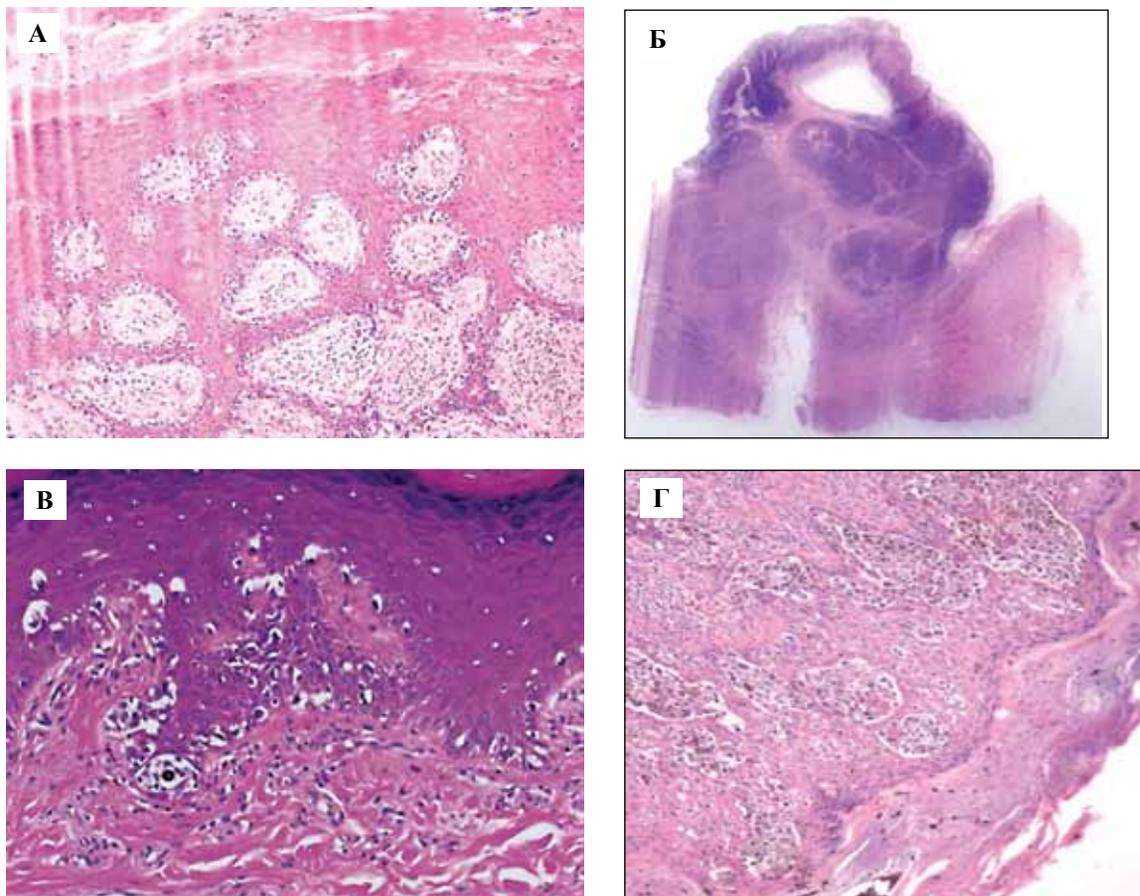


Рис. 2. Гистологические типы подногтевой меланомы. Окраска гематоксилином и эозином.  
 А – акрально-лентигинозная меланнома,  $\times 100$ , Б – узловая меланнома,  $\times 10$ , В – лентигино-меланнома,  $\times 200$ ,  
 Г – поверхностно-распространяющаяся меланнома,  $\times 200$

гистологический тип в 27 наблюдениях (67,5%) оказалась акрально-лентигинозной меланомой, узловой меланомой в семи (17,5%), лентигино-меланомой в четырех (10%), поверхностно-распространяющейся меланомой в двух (5%) случаях (рис. 2).

Основные морфологические особенности ПМ сведены в таблицу 2. В большинстве случаев имелся эпителиоидно-клеточный тип опухоли – 21 (52,5%), в 14 опухолях (35%) – смешанноклеточный. Изъязвление эпидермиса наблюдалось в 27 случаях, что составило 67,5%. Отмечалось отсутствие пигмента или минимальное его количество в ПМ, соответственно, в 17 (42,5%) и в 14 (35%) наблюдениях. Опухоль имела II уровень инвазии по Кларку у одного пациента (2,5%), III – у шести (15%), IV – у 23 (57,5%), V – у 10 (25%). Наиболее часто встречалась толщина опухоли по Бреслоу более 4,1 мм (55%), средняя составила  $5,5 \pm 0,6$  мм (минимальные и максимальные значения равняются 0,2 и 17 мм, соответственно). Средняя митотическая активность составила 30 митозов на  $3 \text{ мм}^2$ . Лимфоидная инфильтрация по степени выраженности в опухоли распределилась в следующем порядке: выраженная – семь (17,5%), умеренно выраженная – 14 (35%) и слабо выраженная –

19 (47,5%). Только в одном случае (2,5%) выявлена частичная спонтанная регрессия ПМ.

В шести случаях (15%) для определения уровня инвазии по Кларку проведена декальцинация пораженной части фаланги. Во всех этих наблюдениях выявлено прорастание опухоли в кость (рис. 3).

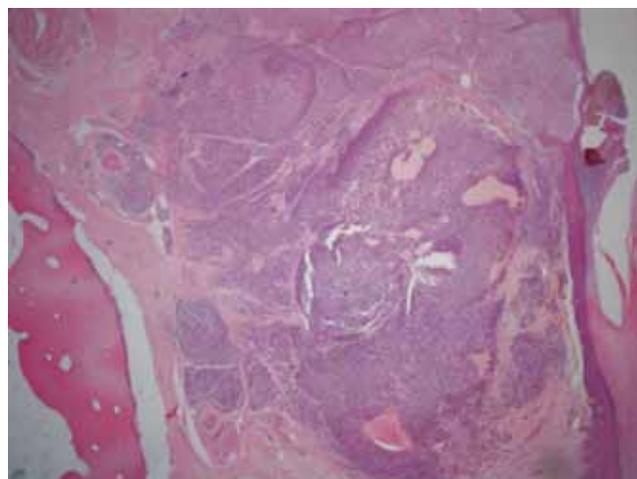


Рис. 3. Прорастание подногтевой меланомы в кость фаланги.  
 Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 25$

Таблица 2

## Морфологические особенности подногтевой меланомы

№	Признак	Характеристика
1	Клеточный тип	
	эпителиоидный	21/40 (52,5%)
	веретенноклеточный	5/40 (12,5%)
	невоклеточный	0/40 (0%)
	смешанный	14/40 (35%)
2	Изъязвление	
	есть	27/40 (67,5%)
	нет	13/40 (32,5%)
3	Наличие пигмента	
	нет	17/40 (42,5%)
	фокально <5%	14/40 (35%)
	умеренное количество 6–50%	8/40 (20%)
	выраженная пигментация >50%	1/40 (2,5%)
4	Уровень инвазии по Кларку	
	I	0/40 (0%)
	II	1/40 (2,5%)
	III	6/40 (15%)
	IV	23/40 (57,5%)
	V	10/40 (25%)
5	Толщина по Бреслоу	
	до 1,0 мм	4/40 (10%)
	1,1–2,0 мм	5/40 (12,5%)
	2,1–4,0 мм	9/40 (22,5%)
	4,1 мм и больше	22/40 (55%)
6	Митотическая активность на 3 мм <sup>2</sup>	
	менее 2	6/40 (15%)
	2–5	8/40 (20%)
	6–10	1/40 (2,5%)
	более 10	25/40 (62,5%)
7	Лимфоидная инфильтрация	
	выраженность	
	слабо выраженная	19/40 (47,5%)
	умеренно выраженная	14/40 (35%)
	выраженная	7/40 (17,5%)
8	Вид регрессии опухоли	
	полная	0/40 (0%)
	частичная	1/40 (2,5%)

При иммуногистохимическом исследовании все опухоли экспрессировали S-100 (рис. 4 А). В большинстве случаев выявлялось окрашивание Melan-A (85,7%) (рис. 4 Б). Была выявлена выраженная экспрессия HMB-45, Ki-67, Tyrosinase во всех опухолях (рис. 4 В, Г, рис. 5 А). Результаты нашего анализа продемонстрировали экспрессию C-kit (CD117) в 25,7% всех случаев (рис. 5 Б). Среди ПМ было выявлено по 3,2% BRAF и ALK позитивных случаев (рис. 5 В, Г). В свою очередь, экспрессия PD-1 и PD-L1 во всех опухолях отсутствовала. В описанных случаях уровень Ki-67 варьировал от 1 до 29%. Количество Phospho-Histone H3 положительных клеток в 3 мм<sup>2</sup> было от 1 до 312 при определении митотической активности (рис. 6). Результаты иммуногистохимического исследования ПМ представлены в таблице 3.

Молекулярно-генетический анализ ПМ проводился в трех случаях на наличие мутаций в генах *BRAF*, *C-kit*, *NRAS*. Только в одной опухоли выявлена мутация *C-kit*, коррелировавшая с экспрессией маркера C-kit (CD117), в остальных случаях мутации не выявлены.

Таблица 3

## Результаты иммуногистохимического исследования подногтевой меланомы

Антиген	0	1+	2+	3+	4+	Всего
S100	0	0	0	0	35	35/35 (100%)
C-kit	26	2	0	3	4	9/35 (25,7%)
BRAF	30	0	0	0	1	1/31 (3,2%)
ALK	30	0	0	0	1	1/31 (3,2%)
HMB45	0	1	0	1	5	7/7 (100%)
Melan A	1	1	0	0	5	6/7 (85,7%)
PD-1	30	0	0	0	0	0/30 (0%)
Tyrosinase	0	0	0	0	5	5/5 (100%)
PD-L1	30	0	0	0	0	0/30 (0%)

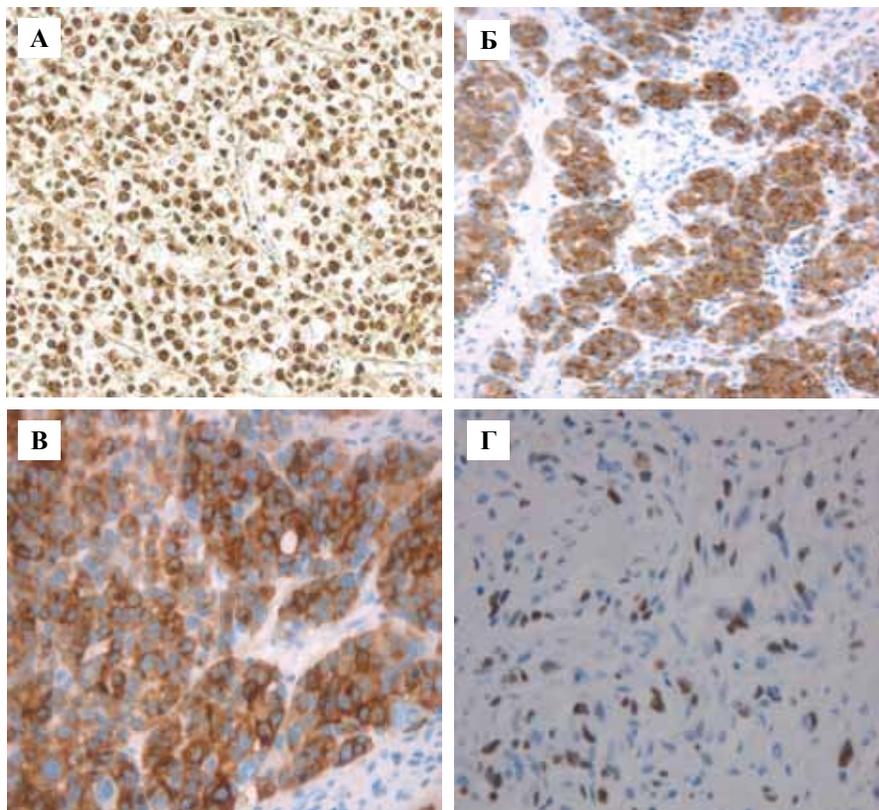


Рис. 4. Иммунопрофиль подногтевой меланомы.

А – цитоплазматическое окрашивание S-100, ×200, Б – цитоплазматическое окрашивание Melan A, ×200, В – цитоплазматическое окрашивание HMB45, ×400, Г – ядерная экспрессия Ki 67, ×400

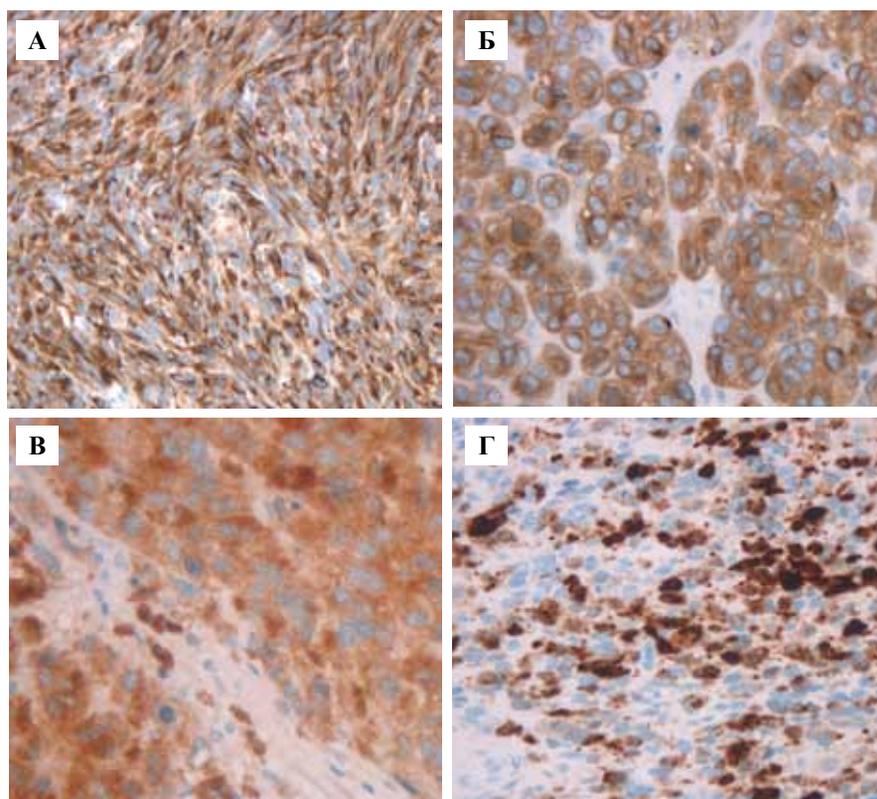


Рис. 5. Иммунопрофиль подногтевой меланомы.

А – цитоплазматическое окрашивание Tyrosinase, ×200, Б – цитоплазматическое окрашивание C-kit, ×400, В – цитоплазматическое окрашивание BRAF, ×400, Г – цитоплазматическое окрашивание ALK, ×400

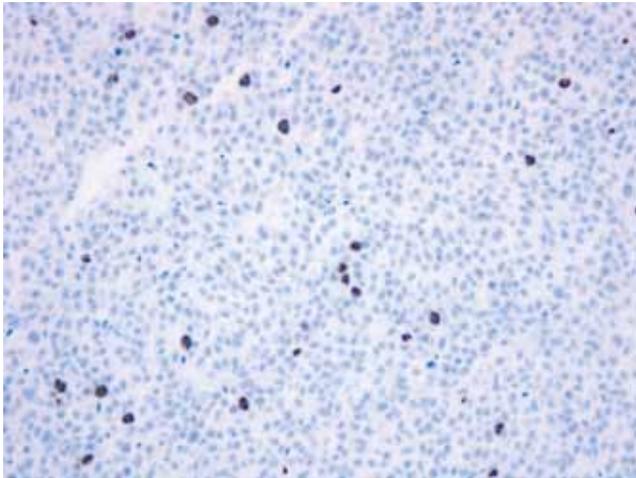


Рис. 6. Определение митотической активности в подногтевой меланоме. Ядерное окрашивание Phospho-Histone H3,  $\times 200$

Для определения наиболее значимых независимых факторов, влияющих на отдаленные результаты лечения, использованы методы однофакторного (Log-rank test) и многофакторного анализа регрессионной модели пропорциональных интенсивностей Кокса (табл. 4).

### Выводы

1. Подногтевая меланомы – морфологически и иммуногистохимически гетерогенная группа меланокитарных новообразований, составляющая 1,6% от всего числа меланом. Среди подногтевых меланом преобладают беспигментные формы (42,5%), акрально-лентигинозный тип строения (67,5%).

2. Высокая частота IV уровня инвазии по Кларку (57,5%) и средняя толщина опухоли по Бреслоу (5,5 мм) свидетельствуют о поздней диагностике подногтевых меланом и вместе с изъязвлением эпителия кожи и поражением костей фаланг пальцев ухудшают прогноз заболевания.

3. Экспрессия C-kit в клетках подногтевых меланом позволяет рассматривать их как мишень для ингибиторов C-kit (иматиниб).

### Литература

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.

## MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SUBUNGUAL MELANOMA

**D.E. Matsko**, M.Y. Myasnyankin, V.V. Anisimov, G.I. Gafton, A.O. Ivantsov

The aim of this work was to study the morphological and immunohistochemical characteristics of subungual melanomas (SM) and their effect on the prognosis of the disease. Forty cases of melanoma with morphologically confirmed diagnosis of subungual melanoma were investigated. According to the results

Таблица 4

### Влияние факторов прогноза на отдаленные результаты лечения подногтевой меланомы

Фактор прогноза	Многофакторный анализ (Cox)	Однофакторный анализ (Log-rank Test)
Изъязвление ПМ	$p=0,03$	$p=0,04$
Уровень инвазии по Кларку	$p=0,07$	$p=0,03$
Поражение кости фаланги	$p=0,04$	$p=0,03$

[Caprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality): Management. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена is a branch of the Federal Medical and Biological Center NIIRT of the Russian Ministry of Health, 2017. 250 s. (In Russ.)].

2. Кудрявцева Г.Т., Борисова Т.Н., Неборак Ю.Т., Курильчик А.А. Клинико-диагностические особенности акральной меланомы кожи и результаты комплексного лечения // Российский онкологический журнал. 2006. № 1. С. 14–17. [Kudryavtseva G.T., Borisova T.N., Neborak Yu.T., Kurilchik A.A. Clinical and diagnostic features of the acral melanoma of the skin and the results of complex treatment // Russian Cancer Journal. 2006. V. 1. P. 14–17. (In Russ.)].
3. Balch C.M., Gershenwald J.E., Soong S.J. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification // J Clin Oncol. 2009;27:6199–206.
4. Barnhill R.L., Piepkorn M., Busam K.J., eds. Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma. 3 rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. 647 p.
5. Cohen T., Busam K.J., Patel A. Subungual melanoma: management considerations // Am J Surg. 2008;195:240–48.
6. Garbe C., Peris K., Hauschild A., Saiag P. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016 // Eur J Cancer. 2016;63:201–17.
7. Gown A.M., Yaziji H. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors // International journal of surgical pathology. 2003;11(1):11–5.
8. Massi G., LeBoit P. Histological diagnosis of nevi and melanoma. 2 nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. 752 p.

of the analysis, it was revealed that SM were extremely heterogeneous in pathomorphological pattern and immunohistochemical profile. The main morphological factors statistically significantly influencing the disease prognosis were identified as follows: Clark's level of invasion, ulceration of the epithelium, and tumor lesion of the bone of the phalanx. In nine cases (25.7%), cytoplasmic staining with C-kit antibody (CD117) occurred. Expression of C-kit in SM cells allows considering them as a target for C-kit inhibitors (imatinib).

*Key words:* subungual melanoma, morphological features, C-kit, prognostic factors

### **Информация об авторах**

Мяснянкин Михаил Юрьевич – кандидат медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 872 3823. E-mail: oncologmisha@gmail.com

Анисимов Валентин Вадимович – доктор медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 952 4158. E-mail: anisimov.doctor@gmail.com

Гафтон Георгий Иванович – доктор медицинских наук, профессор НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 921 956 4771. E-mail: doc-tor@mail.ru

Иванцов Александр Олегович – кандидат медицинских наук, НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова.

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Телефон 8 911 932 7592. E-mail: shurikiv@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 21 июня 2017 года*

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СУПЕРИНВАЗИОННОМ ОПИСТОРХОЗЕ

**В.Г. Бычков<sup>1</sup>, С.Д. Лазарев<sup>1</sup>, Е.Д. Хадиева<sup>2</sup>,  
В.М. Золотухин<sup>3</sup>, Д.В. Прокопов<sup>3</sup>, И.В. Безусова<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, Тюмень

<sup>2</sup> БУ ВО «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» ХМАО-Югры, Ханты-Мансийск

<sup>3</sup> ГАУЗ ТО МКМЦ «Медицинский город» патологоанатомическое бюро, Тюмень

<sup>4</sup> ГБУЗ ТО «Областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Яркское отделение, с. Ярково

Комплексное исследование параметров печени у живых и умерших лиц с описторхозной инвазией установило выраженное ремоделирование органа, формирование aberrантных желчных протоков между печенью и желчным пузырем, в связках печени с вегетированием в них паразитов и развитием холангиоцеллюлярного рака. Отмеченные изменения связочного аппарата печени и формирование aberrантных желчных протоков отражают системную пролиферативную реакцию и канцерогенез при суперинвазионном описторхозе.

*Ключевые слова:* печень, желчные протоки, описторхоз

Описторхоз человека – паразитарное заболевание, вызываемое трематодой *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884), впервые был обнаружен в Сибири патологоанатомом профессором К.Н. Виноградовым в 1891 году [4]. Заболевание является одним из самых социально значимых гельминтозов в России и других странах. Ареал возбудителя описторхоза захватывает не только Сибирь, но и весь евроазиатский континент, причем показатели заболеваемости, несмотря на усилия специалистов по профилактике и лечению, не снижаются, а имеют тенденцию к увеличению [6, 7]. Появляются новые местные случаи острого описторхоза, в том числе в Московской области, центральной Италии [9, 10].

Гельминтоз имеет системный характер с многочисленными проявлениями и осложнениями в виде гиперэозинофильного синдрома, в частности эозинофильноклеточного миокардита, эозинофильной пневмонии («летучие инфильтраты»), экссудативных и пролиферативных осложнений, паразитарной нефропатии с исходом в хроническую болезнь почек и других соматических проявлений. Наиболее выраженным структурным преобразованием подвержена печень, где вегетируют паразиты [3, 11, 14, 15].

Анатомическое строение печени и желчного пузыря при различных заболеваниях подвергается ремоделированию, что иногда сопровождается осложнениями при хирургических вмешательствах на органах брюшной полости [1, 5]. Выраженные анатомические изменения печени и желчного пузыря наблюдаются при хрониче-

ском описторхозе [8, 11, 12] и создают трудности при хирургическом пособии пациентам, а иногда служат источниками ятрогений и ятрогенной патологии [13, 16]. Тем не менее сведения об изменениях билиарной структуры печени при суперинвазионной форме болезни фрагментарны и изучены недостаточно [3, 17].

Целью нашего исследования было выявление ремоделирования интра- и экстрамуральных желчных путей при описторхозе для определения рисков хирургических ятрогений.

## Материалы и методы

Обследованы пациенты без описторхозной инвазии (52) – I группа, с хроническим описторхозом (50) – II группа, в группу III включены пациенты (72) с суперинвазионным описторхозом (СО) (длительность инвазии более 15 лет). Исследован аутопсийный материал комплексов печень – желчный пузырь – внепеченочные желчные протоки лиц (20), при жизни страдавших СО (IV группа). Проведены УЗИ с помощью ультразвуковой аппаратуры экспертного класса HDI 5000 фирмы Philips (Нидерланды), ручное препарирование внепеченочных желчных протоков, использованы материалы патологоанатомических отделений медицинских организаций в гипер-, мезо- и гипозендемичных очагах описторхоза (Ханты-Мансийск, Тобольск, Тюмень, Курган). Секционный материал окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, альциановым синим, иммуногистохимическое исследование выполняли с антителами к рецепторам

CD-34, цитокератину 7, белку Ki 67 по рекомендациям фирм-производителей (Spring Bioscience, США, Leica Biosystems, Германия).

### Результаты

Размеры печени по данным УЗИ и морфометрии органа умерших лиц при хроническом описторхозе без повторных заражений приближались к таковым у пациентов без инвазии.

При СО с многочисленными повторными заражениями печень была увеличена по всем параметрам и массе ( $p < 0,05-0,01$ ). Интрамуральные желчные протоки расширены: диаметр магистральных протоков достигал 6,2 мм, общего желчного протока – до 0,8 см, в восьми наблюдениях имелись цилиндрические и мешотчатые холангиоэктазии с диаметром просвета  $2,01 \pm 0,46$  см. Кроме того, обнаружены холангиоэктазии, расположенные под капсулой печени и внутри стенки капсулы, – подкапсульные и внутрикапсульные эктазии встречались в 52,8% исследуемого материала. В пяти наблюдениях выявлено уменьшение диаметра общего желчного протока до 0,18 см с одновременным увеличением толщины его стенки.

**Морфология связок печени.** Венечная связка (*ligamentum coronarium*) с гладкой поверхностью, длиной  $2,6 \pm 2,2$  см, при гистологическом исследовании в норме наблюдались единичные эпителиоциты с положительной реакцией к рецепторам цитокератина 7, фигуры деления в клетках не отмечались. В серповидной связке (*ligamentum falciforme*) на уровне переднего края наряду со скоплениями эпителиоцитов определяются единичные островки протоковых структур. Треугольные связки и *ligamentum hepatorenale* имеют типичное строение, цитокератинположительные элементы не выявлены. В печеночно-желудочной связке и *ligamentum hepato-duodenale* проследжены сформированные мелкие образования из низкого цилиндрического эпителия в виде протоков без желчи в просвете.

При СО с длительным сроком инвазии в связках печени и соединительнотканной пленке между печенью и желчным пузырем сформированы дополнительные, aberrantные желчные протоки (АЖП), содержащие желчь. Выявлено два вида aberrantных желчных протоков: протоки магистрального и рассыпного типов (диаметр до 2 мм), которые достигают серозной оболочки пузыря и распространяются по мышечной, не проникая в последнюю. В просвете магистральных протоков вне пузыря и печени вегетируют жизнеспособные описторхисы (рис. 1, 2).

Стенки всех протоков резко утолщены, склерозированы, слизистая оболочка состоит из высокого многорядного цилиндрического эпителия с пролиферативной активностью (ПА) по Ki 67 1,5%, активно секретирующего слизь; наблюдаются многочисленные истинные сосочковые образования, псевдососочки и аденоматозные структуры (рис. 3, 4, 5).

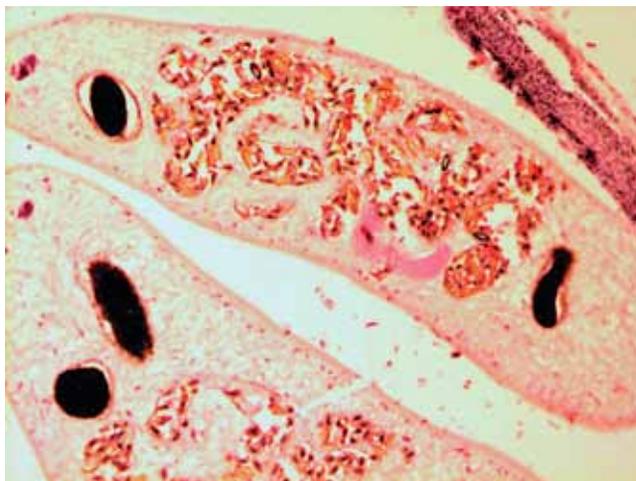


Рис. 1. Описторхисы в просвете aberrантного протока между печенью и желчным пузырем. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$



Рис. 2. Описторхис в магистральном добавочном желчном протоке и склерозирующая внутрипротоковая гранулема. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

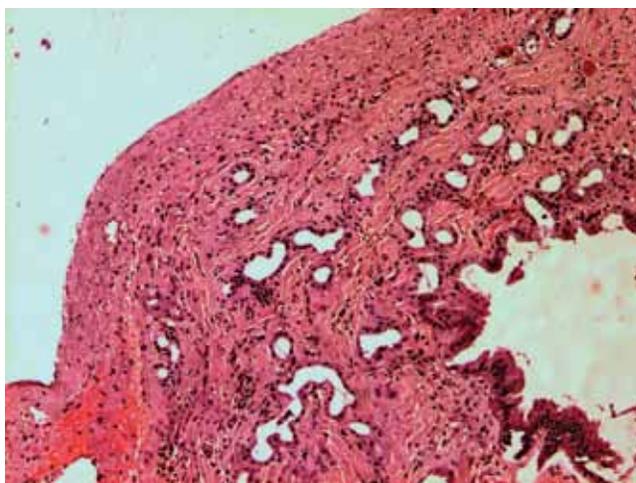


Рис. 3. Утолщенная стенка aberrантного желчного протока с железистыми структурами из клеток холангиоцеллюлярного дифферона. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

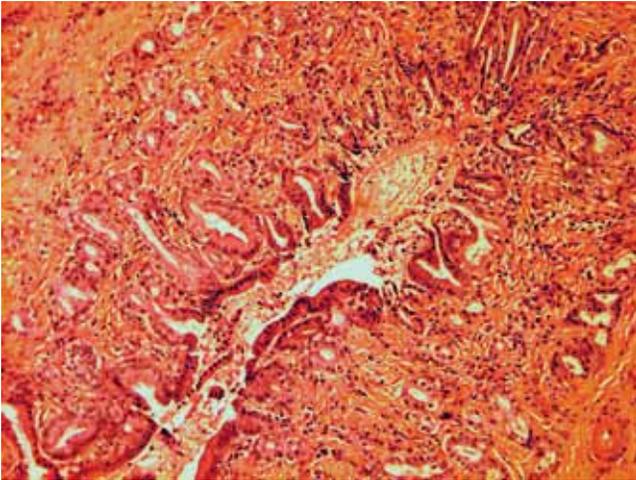


Рис. 4. Ветвь магистрального aberrантного желчного протока. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$



Рис. 5. Железистые структуры из клеток холангиоцеллюлярного дифферона. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Экстрамуральные желчные протоки изменяются на всем протяжении желчевыводящего тракта: склерозируются и удлиняются до 4–5 см, общий печеночный и пузырный протоки имеют извитой вид; в двух наблюдениях выявлен спавшийся желчный пузырь, просвет *ductus cysticus* резко сужен. Общий желчный проток длиной 5–11 см, с выраженными склеротическими процессами вокруг, в стенке и пролиферацией элементов холангиоцеллюлярного дифферона (ХЦД) в слизистой (ПА – 1,8%), что создает условия для развития экстра-, интер- и интрадуктального стеноза и подпеченочной желчной гипертензии. Запирательный мышечный аппарат склерозирован, просвет большого дуоденального сосочка стенозирован.

Желчный пузырь в 11,1% наблюдениях был увеличен (объем  $322,0 \pm 6,4$  мл) (рис. 6), в трех случаях наблюдали отключенный желчный пузырь, 13 макро-

препаратов желчных пузырей увеличены в размерах на 2,7% по сравнению с нормой. Преимущественно в теле пузыря стенки их резко склерозированы, мышечные волокна окружены зрелой соединительной тканью, слизистая оболочка неравномерно утолщена или атрофична. В слизистой оболочке в области дна, воронки и шейки выявляются расширенные каналы (ходы Люшка, рис. 7), доходящие до серозной оболочки, пронизывая мышечную.

В мышечном слое формируются расширенные тубулярные и альвеолярные структуры синусов Ашофа–Рокитанского (рис. 8), во всех случаях наблюдали картину хронического воспаления и пролиферативные реакции элементов ХЦД.

Под серозной оболочкой пузыря выявлена сеть магистральных и рассыпных aberrантных протоков, в которых диагностированы два наблюдения холангио-



Рис. 6. Увеличенный желчный пузырь при суперинвазивном описторхозе

целлюлярного рака (ХЦР): высокодифференцированная холангиокарцинома без метастазов в лимфатические узлы (рис. 9) и ХЦР с метастазами в край печени (рис. 10).

Опухолевая ткань распространилась интраканаликулярно вплоть до нижнего края, переходя на паренхиму печени (рис. 11).

В клетчатке ворот печени и перидуктальном пространстве обнаружены диссипативные скопления клеток холангиоцеллюлярного дифферона, формирующие мелкие тубулярные структуры.

### Обсуждение

*Opisthorchis felineus* вызывает экспрессию пролиферативных генов [2], необходимых для обеспечениянутрицевического субстрата – эпителия желчных протоков, где вегетируют гельминты, а печень становится

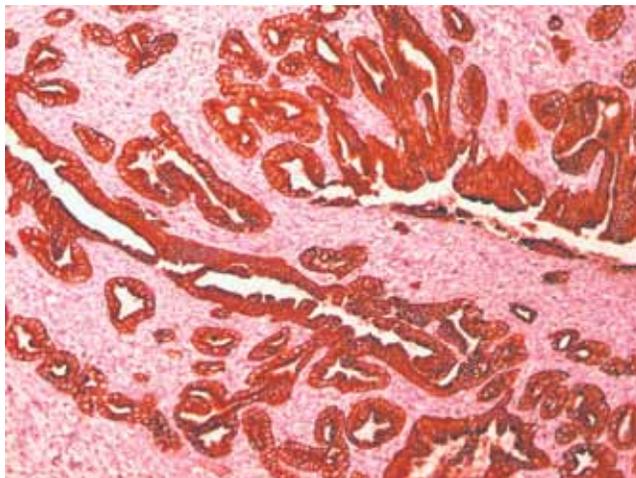


Рис. 7. Ходы Льюшка с пролиферацией холангиоцеллюлярного эпителия. ИГХ реакция с антителами цитокератина 7,  $\times 200$

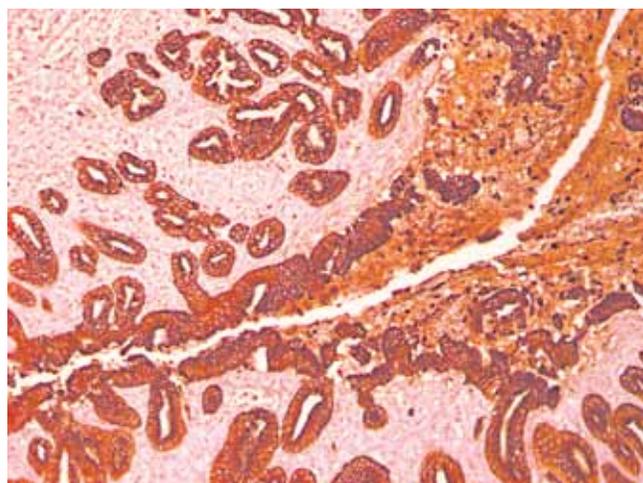


Рис. 8. Тубулярные и альвеолярные структуры синусов Ашоффа–Рокитанского. ИГХ реакция с антителами цитокератина 7,  $\times 200$

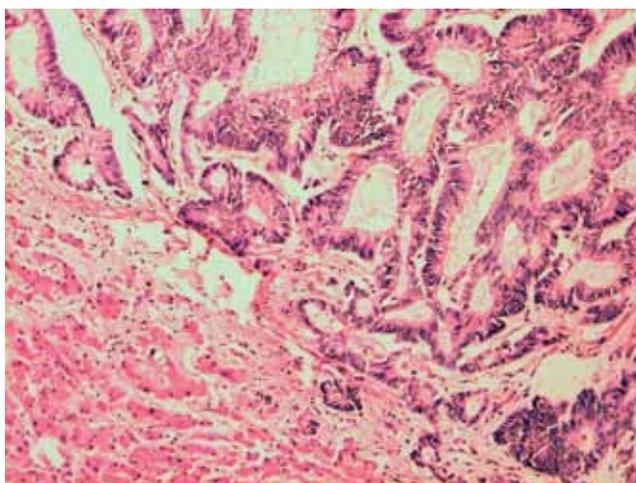


Рис. 9. Высокодифференцированная аденокарцинома абберрантного желчного протока. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

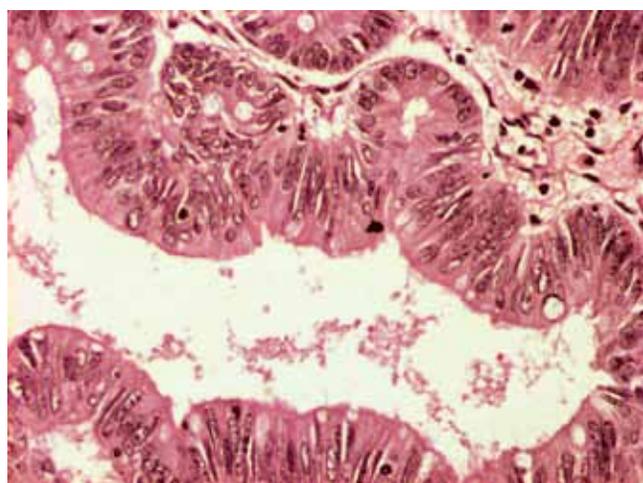


Рис. 10. Холангиоцеллюлярный рак абберрантного желчного протока. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

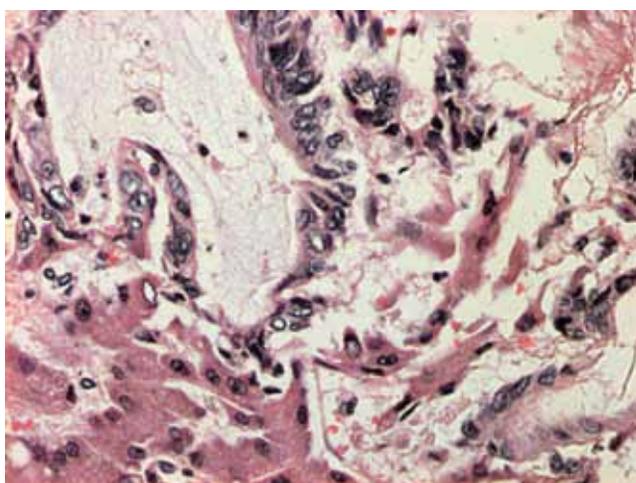


Рис. 11. Интраканаликулярное метастазирование аденокарциномы добавочного желчного протока в край печени. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

перманентно пролиферирующим органом, что создает условия для канцерогенеза, в том числе в аберрантных протоках.

Морфологическое исследование АЖП показало грубое строение стенок, что не приводит к их перфорации и развитию пропотного и прободного желчного перитонита, последний развивается в результате пропотевания желчи и (или) перфорации подкапсульных желчных эктазий на фоне желчной гипертензии. Желчный перитонит с вовлечением АЖП возникает только после хирургических вмешательств, то есть их пересечении или надрезах.

В результате анализа литературы и данных собственного исследования установлены изменения анатомической структуры печени при суперинвазионном описторхозе: увеличение размеров и массы органа объясняется хроническим венозным полнокровием (пре- и постсинусоидальная гипертензия) и желчной гипертензией, то есть накоплением желчи в расширенных протоках и холангиоэктазах, повреждение которых при слепой пункции печени может осложниться развитием желчного перитонита. Длительно текущая желчная гипертензия подпеченочного генеза и системный пролиферативный эффект описторхисов способствуют формированию добавочных желчных протоков, включившихся в билиарную систему печени.

## Выводы

1. При хроническом описторхозе с повторными заражениями наблюдаются выраженные процессы анатомического ремоделирования печени, экстрамуральной желчевыводящей системы, что следует учитывать при хирургических вмешательствах на органах верхнего этажа брюшной полости с целью профилактики ятрогенных осложнений, то есть развития желчного перитонита.

2. Для профилактики ятрогенной патологии необходимо перевязка дополнительных желчных протоков или электрокоагуляция.

3. В аберрантных желчных протоках возможно вегетирование описторхисов и развитие холангиокарцином.

## Литература

1. Альперович Б.И. Хирургия печени. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 352 с. [Alperovich B.I. Hirurgiya pecheni. M.: GEOTAR-Media, 2010. 352 s. (In Russ.)].
2. Бычков В.Г., Сергиев В.П., Сабиров А.Х., Крылов Г.Г., Хадиева Е.Д. Молекулярно-генетические подходы в паразитологии (на примере описторхоза) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2007. № 2. С. 3–6. [Byichkov V.G., Sergiev V.P., Sabirov A.H., Krylov G.G., Hadieva E.D. Molekulyarno-geneticheskie podhody v parazitologii (na primere opistorhoza) // Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni. 2007. № 2. S. 3–6. (In Russ.)].
3. Бычков В.Г., Соловьева О.Г., Хадиева Е.Д., Иванова Л.А., Куликова С.В. Морфогенез структурных преобразований внутренних органов при суперинвазионном описторхозе // Морфология. 2011. Т. 140, № 5. С. 22–27. [Byichkov V.G., Soloveva O.G., Hadieva E.D., Ivanova L.A., Kulikova S.V. Morfogenez strukturnykh preobrazovaniy vnutrennih organov pri superinvazionnom opistorhoze // Morfologiya. 2011. T. 140, № 5. S. 22–27. (In Russ.)].
4. Виноградов К.Н. Второй случай сибирской двуустки (*Distomum sebiricum*) в печени человека / Отдельный оттиск. Томск, 1891. [Vinogradov K.N. Vtoroy sluchay sibirskoy dvuustki (*Distomum sebiricum*) v pecheni cheloveka / Otdelnyiy ottisk. Tomsk, 1891. (In Russ.)].
5. Вишневецкий В.А., Ефанов М.Г., Икрамов Р.З., Назаренко Н.А., Шевченко Т.В. Билиарные осложнения после резекции печени по поводу различных очаговых поражений: Материалы XIX Международного конгресса хирургов-гепатологов России и стран СНГ. Иркутск, 2012. С. 41–42. [Vishnevskiy V.A., Efanov M.G., Ikramov R.Z., Nazarenko N.A., Shevchenko T.V. Biliarnye oslozhneniya posle rezeksii pecheni po povodu razlichnykh ochagovykh porazheniy: Materialy XIX Mezhdunarodnogo kongressa hirurgov-gepatologov Rossii i stran SNG. Irkutsk, 2012. S. 41–42. (In Russ.)].
6. Григорьева И.Н. Описторхоз: традиции и инновации // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. № 4. С. 54–59. [Grigoreva I.N. Opistorhoz: traditsii i innovatsii // Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2012. № 4. S. 54–59. (In Russ.)].
7. Гузеева Т.М. Состояние заболеваемости паразитарными болезнями в Российской Федерации и задачи в условиях реорганизации службы // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2008. № 1. С. 3–11. [Guzeeva T.M. Sostoyanie zabolevaemosti parazitarnymi boleznyami v Rossiyskoy Federatsii i zadachi v usloviyah reorganizatsii sluzhby // Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni. 2008. № 1. S. 3–11. (In Russ.)].
8. Елишев О.Г., Бычков В.Г., Зиганшин Р.В., Орлов С.А., Белов Н.Н. Ультразвуковое исследование печени у больных описторхозом // Научный вестник ТГМА. 2001. № 5. С. 44–45. [Elishev O.G., Byichkov V.G., Ziganshin R.V., Orlov S.A., Belov N.N. Ultrazvukovoe issledovanie pecheni u bolnykh opistorhozom // Nauchnyiy vestnik TGMA. 2001. № 5. S. 44–45. (In Russ.)].
9. Завойкин В.Д., Ахмарова И.М., Зеля О.П. Местный случай острого описторхоза в Московской области // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2014. № 4. С. 52–54. [Zavoykin V.D., Ahmarova I.M., Zelya O.P. Mestnyiy sluchay ostrogo opistorhoza v Moskovskoy oblasti // Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni. 2014. № 4. S. 52–54. (In Russ.)].
10. Завойкин В.Д., Зеля О.П., Тихонова Д.В., Тумольская Н.И. Клинико-эпидемиологические аспекты гельминтозов, передающихся через рыбу // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017. № 3. С. 41–47. [Zavoykin V.D., Zelya O.P., Tihonova D.V., Tumolskaya N.I. Kliniko-epidemiologicheskie aspektyi gelmintozov, peredayuschihsy cherez rybu // Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni. 2017. № 3. S. 41–47. (In Russ.)].
11. Зиганшин Р.В. Хирургические осложнения описторхоза печени и желчного пузыря: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Пермь, 1977. 32 с. [Ziganshin R.V. Hirurgicheskie oslozhneniya opistorhoza pecheni i zhelchnogo puzыря: Avtoref. dis. ... dokt. med. nauk. Perm, 1977. 32 s. (In Russ.)].

- opistorhoza pečeni i zhelchnogo puzyrya: Avtoref. dis. ... dokt. med. nauk. Perm, 1977. 32 s. (In Russ.).
12. Зуевский В.П., Бычков В.Г., Дерпач Т.В., Овчаренко В.Г. Экстраполяция морфологических данных поражения печени при экспериментальном описторхозе золотистых хомяков на человека // Медицинская наука и образование Урала. 2016. Т. 17, № 2 (86). С. 124–126. [Zuevskiy V.P., Bychkov V.G., Derpach T.V., Ovcharenko V.G. Ekstrapolyatsiya morfologicheskikh daniyih porazheniya pečeni pri eksperimentalnom opistorhoze zolotistyih homyakov na cheloveka // Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala. 2016. T. 17, № 2 (86). S. 124–126. (In Russ.).]
  13. Кислицин Д.П., Хрячков В.В., Колмачевский Н.А., Добровольский А.А. Осложнения при резекции печени в эндемическом очаге описторхоза: Материалы XIX Международного конгресса хирургов-гепатологов России и стран СНГ. Иркутск, 2012. С. 51–52. [Kislitsin D.P., Hryachkov V.V., Kolmachevskiy N.A., Dobrovolskiy A.A. Oslozhneniya pri rezektsii pečeni v endemicheskom ochage opistorhoza: Materialy XIX Mezhdunarodnogo kongressa hirurogov-gepatologov Rossii i stran SNG. Irkutsk, 2012. S. 51–52. (In Russ.).]
  14. Начева Л.В., Беззаботнов Н.О., Нестерок Ю.А., Лутягина А.В. Морфологические изменения печени и желчевыводящих протоков золотистых хомяков при экспериментальном описторхозе // Вестник Бурятского государственного университета. 2013. № 4. С. 170–174. [Nacheva L.V., Bezzabotnov N.O., Nesterok Yu.A., Lityagina A.V. Morfologicheskie izmeneniya pečeni i zhelchevyivodyaschih protokov zolotistyih homyakov pri eksperimentalnom opistorhoze // Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta. 2013. № 4. S. 170–174. (In Russ.).]
  15. Павлова Т.И., Бычков В.Г., Крылов Г.Г., Иванова А.А. Количественные характеристики и особенности эхографической картины печени, билиарной зоны при описторхозе гиперэндемического очага // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2009. № 2. С. 17–19. [Pavlova T.I., Bychkov V.G., Krylov G.G., Ivanova A.A. Kolichestvennyye harakteristiki i osobennosti ehograficheskoy kartiny pečeni, biliarnoy zonyi pri opistorhoze giperendemichnogo ochaga // Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni. 2009. № 2. S. 17–19. (In Russ.).]
  16. Хрячков В.В., Кислицин Д.П., Добровольский А.А. Технические особенности резекции печени при описторхозном поражении с использованием технологий гемобилиостаза // Научный медицинский вестник Югры. 2014. № 1–2. С. 216–219. [Hryachkov V.V., Kislitsin D.P., Dobrovolskiy A.A. Tehnicheskie osobennosti rezektsii pečeni pri opistorhoznom porazhenii s ispolzovaniem tehnologiy gemobiliostaza // Nauchnyy meditsinskiy vestnik Yugryi. 2014. № 1–2. S. 216–219. (In Russ.).]
  17. Magen E., Bychkov V., Ginovker A., Kashuba E. Chronic Opisthorchis felineus infection attenuates atherosclerosis – an autopsy study // International Journal for Parasitology. 2013;43:819.

## MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE BILIAL SYSTEM IN SUPERINVASIVE OPISTHORCHIASIS

V.G. Bychkov, S.D. Lazarev, E.D. Khadieva, V.M. Zolothukhin, D.V. Prokopov, I.V. Bezusova

Complex study of liver parameters in living and dead persons with opisthorchiasis invasion revealed the pronounced organ remodeling, formation of aberrant bile ducts between the liver and gallbladder in the liver ligaments accompanied with parasitic vegetation and the development of cholangiocellular carcinoma. The noted changes in the hepatic ligaments and the formation of aberrant bile ducts are due to systemic proliferative reaction and carcinogenesis in superinvasive opisthorchiasis.

*Key words:* liver, bile ducts, opisthorchiasis

### Информация об авторах

Бычков Виталий Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины Тюменского государственного медицинского университета.

Адрес: 625023, Тюмень, ул. Одесская, д. 54.

Лазарев Семен Дмитриевич – ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины Тюменского государственного медицинского университета.

Адрес: 625023, Тюмень, ул. Одесская, д. 54. Телефон 8 922 072 8376. E-mail: raproerk@mail.ru

Хадиева Елена Дмитриевна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины Ханты-Мансийской государственной медицинской академии.

Адрес: 628011, Ханты-Мансийск, ул. Мира, д. 40.

Золотухин Владимир Михайлович – заведующий отделением прижизненной диагностики МКМЦ «Медицинский город».

Адрес: 625032, Тюмень, ул. Юрия Семовских, д. 14.

Прокопов Дмитрий Викторович – врач-патологоанатом патологоанатомического бюро МКМЦ «Медицинский город».

Адрес: 625032, Тюмень, ул. Юрия Семовских, д. 14.

Безусова Ирина Владимировна – врач судебно-медицинский эксперт Яркского отделения Областного бюро судебно-медицинской экспертизы Тюменской области.

Адрес: 626050 Тюменская область, Яркский район, с. Ярково, ул. Ленина д. 68.

Материал поступил в редакцию 10 августа 2017 года

# ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ JAK2-ПОЗИТИВНОЙ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИИ

*Д.А. Дьяконов, Н.С. Федоровская, В.А. Росин, Е.С. Фокина, Е.В. Трегубова*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

Эссенциальная тромбоцитемия является Ph-негативным хроническим миелопролиферативным заболеванием и характеризуется пролиферацией в костном мозге преимущественно мегакариоцитарного ростка кроветворения. В большинстве случаев удается обнаружить точечную мутацию V617F в гене *JAK2*, приводящую к трансформации гемопоэтической клетки. Для верификации диагноза разработаны определенные диагностические критерии. Особое место отводится гистологическому исследованию костного мозга – трепанобиопсии. Для выявления мутаций, нарушающих пролиферацию клеток мегакариоцитопоэза, необходим и молекулярно-генетический анализ. Однако сопоставление патогистологического состояния костного мозга со статусом *JAK2* в зависимости от генетической мутации V617F при эссенциальной тромбоцитемии не проводилось. Цель нашего исследования – изучение состояния кроветворения и патоморфологических особенностей клеток мегакариоцитарного ряда в трепанобиоптатах костного мозга в зависимости от мутации *JAK2V617F*. Анализ проведен с применением гистологического и морфометрического методов исследования. Установлено, что нарушения гистоархитектоники костной и жировой ткани у больных имели связь с мутацией V617F в гене *JAK2*. Определены процессы повышенного костеобразования у пациентов, не имевших изменений мутационного статуса. Отмечены отклонения адипоцитов, в большей степени характерные для больных без мутации *JAK2V617F*. Выявлено увеличение числа мегакариоцитов в 1 мм<sup>2</sup> у всех обследуемых в сравнении с нормой. Установлено, что клетки мегакариоцитарного ряда при эссенциальной тромбоцитемии имеют отличительные черты локализации с формированием рыхлых кластеров. Относительное повышение количества мегакариоцитов в виде макроформ со зрелой морфологией и извилистыми контурами ядер наиболее характерно для пациентов, не имевших генетических аномалий. В целом полученные данные отражают зависимость патоморфологических особенностей состояния миелопоэза и клеток мегакариоцитарного ростка кроветворения от наличия мутации в гене *JAK2*. Результаты исследований расширяют представление об особенностях течения патологического процесса и дают дополнительную информацию для патоморфологов.

*Ключевые слова:* эссенциальная тромбоцитемия, мегакариоциты, гистология, костный мозг

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) относится к группе клональных Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний, характеризующихся пролиферацией в костном мозге мегакариоцитарного ростка кроветворения. В результате в периферической крови у пациентов увеличивается количество тромбоцитов, обусловленное повышенным образованием кровяных пластинок [6]. В последние годы достигнуты значительные успехи в расшифровке молекулярно-генетических механизмов ЭТ. Установлено, что в основе развития болезни лежит сложный клональный миелопролиферативный процесс, развивающийся в результате изменений в ранних гемопоэтических предшественниках с одновременной активацией JAK-STAT клеточного сигнального пути, который регулирует рост, дифференцировку, адгезию и апоптоз клеток ме-

гакариоцитарного ряда [4]. Приблизительно в 25–55% случаев удается обнаружить точечную мутацию V617F в гене тирозинкиназы *JAK2*, участвующую в передаче сигнала с цитокиновых рецепторов [7]. Результатом являются изменения, развивающиеся прежде всего в костном мозге и окружающих его тканях; происходят структурные трансформации микроокружения, формирующего гемопоэтическую нишу (адипоциты, клетки стромы и т.д.) [3].

Для верификации диагноза международной рабочей группой по диагностике и лечению ЭТ разработаны диагностические критерии, принятые Всемирной организацией здравоохранения [2, 5, 8]. Особое место отводится гистологическому анализу трепанобиоптатов костного мозга, дающему возможность наиболее полно оценить состояние кроветворения и степень

фиброза [9]. Необходимость исследования обусловлена тесной связью патогенетических механизмов болезни с изменениями, происходящими в центральном кроветворном органе. Возможность изучать количественный состав клеток мегакариоцитарного ряда, получать подробную патоморфологическую характеристику и выявлять особенности их локализации позволяет относить трепанобиопсию к одному из основных методов диагностики. Тем не менее специфика тканевой реорганизации состояния кроветворения при ЭТ на сегодняшний день изучена недостаточно. В современной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные анализу данной проблемы, и в большей степени они носят описательный характер. Открытым остается вопрос относительно состояния гистоархитектоники костного мозга в зависимости от наличия или отсутствия *JAK2V617F* мутации [1, 6].

В результате молекулярно-генетических нарушений и активации *JAK-STAT* сигнального пути, проявляющихся преимущественно пролиферацией мегакариоцитарного роста, происходят определенные изменения мегакариоцитов, однако в современной литературе данных о количественных особенностях, патоморфологическом состоянии клеток мегакариоцитарного ряда в зависимости от мутационного статуса *JAK2* у пациентов с ЭТ недостаточно. Сопоставление результатов гистологических и молекулярно-генетических исследований расширит представление о специфике течения болезни и даст дополнительную информацию для более точной оценки патологического процесса, прогноза заболевания и своевременного выбора терапевтической тактики.

Целью исследования было изучение состояния кроветворения и патоморфологических особенностей мегакариоцитов в гистологических срезах костного мозга в зависимости от *JAK2* статуса у пациентов с ЭТ.

## Материалы и методы

Для анализа взяты биопсийные образцы костного мозга у 36 пациентов с ЭТ (10 мужчин, 26 женщин). Общая медиана возраста составила 51 год. Гистологическая оценка трепанобиоптатов выполнена во время первого обращения пациентов в клинику института. Диагноз установлен на основании принятых критериев согласно современной классификации Всемирной организации здравоохранения [2]. Группу 1 составили обследуемые, у которых выявлены точечные мутации в гене *JAK2* ( $n=21$ ); в группу 2 включены пациенты с отсутствием данной перестройки ( $n=15$ ). Сравнительный анализ осуществляли с образцами трепанобиоптатов от 18 доноров костного мозга, не имевших в анамнезе заболеваний системы крови и сопоставимых по возрасту (группа сравнения). Обследование проведено в соответствии с современными принципами биомедицинской этики и безопасности клинических исследований.

Изучение материала проводилось на парафиновых гистологических срезах по стандартным методам

окраски: гематоксилином и эозином, суданом III, импрегнация серебром. При иммуногистохимическом окрашивании использовались первичное антитело CD61 (клон 2F2) в готовом разведении и система визуализации EnVISION (DAB+). Морфометрическую оценку осуществляли при помощи светового микроскопа Leica (Германия) со встроенной фотовидеокамерой и морфометрического программного обеспечения анализа изображений ImageScore Color, версии M. Измерение тканевых структур для каждого образца проведено с использованием объектива  $\times 4$  и окуляров  $\times 10$ . Количественный подсчет мегакариоцитов выполнен при объективе  $\times 40$ , окулярах  $\times 10$ .

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакетов программ SPSS for Windows version 19. Для выявления достоверности различий использовали непараметрические двусторонние критерии Крускала–Уоллиса. Результаты исследований представлены с указанием среднего значения и стандартного среднеквадратического отклонения. При оценке качественных признаков задействовали метод  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса. В случаях малого числа наблюдений анализ проводился с помощью точного двустороннего критерия Фишера.

## Результаты и обсуждение

В процессе гистологического изучения трепанобиоптатов у пациентов с ЭТ установлены слабо выраженные изменения костной ткани, среди которых преобладали косвенные признаки процессов костеобразования в виде неравномерного утолщения костных балок с нарушением хода линии цементации. Патоморфологические признаки остеосклероза не выявлены. На поверхности костных балок отмечено увеличение количества эндостальных остеопрогениторных клеток, встречались небольшие участки рассасывания по типу гладкой резорбции. При морфометрическом исследовании отмечено, что объем костной ткани достоверно ниже у пациентов с мутацией V617F в гене *JAK2* в сравнении с нормой ( $p=0,027$ ) и пациентами группы 2 ( $p=0,004$ ; табл. 1). У обследуемых без изменений мутационного статуса определено увеличение ее площади ( $p=0,019$ ).

В результате оценки гемопоэтической ткани костный мозг у пациентов характеризовался нормальной клеточностью. Гранулоцитарный росток представлен клеточными элементами на разных стадиях созревания без выраженных признаков омоложения. Эритроидный ряд имел нормобластоидный тип кроветворения, клетки локализовались небольшими скоплениями и дискретно по всему срезу. Лейкоэритробластическое соотношение находилось в пределах нормальных значений. В отличие от группы сравнения у всех пациентов с ЭТ отмечена выраженная односторонняя пролиферация элементов мегакариоцитопоэза. Установлено, что мегакариоциты располагались в средней и центральной зонах межтрабекулярных костномозговых полостей,

Таблица 1

Сравнение тканевых структур в трепанобиоптатах костного мозга при ЭТ с учетом мутации V617F в гене *JAK2*

Параметры	Группа сравнения	Пациенты с ЭТ	Группа 1 ( <i>JAK2</i> -+)	Группа 2 ( <i>JAK2</i> -)
Костная ткань, %	22,1±2,0	23,0±2,3	16,9±1,7*/**	31,8±2,7*/**
Гемопоэтическая ткань, %	37,2±1,7	34,0±2,4	38,9±3,1**	27,5±3,1*/**
Жировая ткань, %	40,7±3,1	43,0±2,7	44,1±3,3	40,7±5,2

\* – статистическая значимость различий с данными группы сравнения;

\*\* – статистическая значимость различий между данными групп 1 и 2 (здесь и в следующих таблицах)

на удалении от поверхности костных балок, локализовались разрозненно, преимущественно вокруг синусоидных сосудов. В единичных случаях выявлены небольшие группы из 2–3 клеток. Значительная часть мегакариоцитов была представлена клетками крупных размеров с гиперсегментированными ядрами, широкой цитоплазмой. При выполнении морфометрических исследований определено, что площадь кроветворной ткани у пациентов без мутации *JAK2V617F* достоверно меньше при сопоставлении с группой сравнения ( $p=0,019$ ) и с пациентами, имевшими генетические нарушения в гене *JAK2* ( $p=0,031$ ). В большей степени такие изменения обусловлены не столько сужением ростков миелопоэза, сколько увеличением площади костной ткани в группе 2.

В ходе оценки жировой ткани в гистологических срезах костного мозга отмечено равномерное распределение адипоцитов как в норме, так и при ЭТ. Количество адипоцитов в 1 мм<sup>2</sup> среза сопоставлялось между донорами и пациентами с ЭТ (табл. 2). В результате изучения размеров клеток жировой ткани установлено статистически значимое увеличение их площади при ЭТ при сопоставлении с группой сравнения ( $p=0,017$ ). Отмеченные изменения более характерны для пациентов с отсутствием мутации *JAK2V617F* ( $p=0,039$ ).

При окраске на ретикулин степень ретикулинового фиброза (MF) у всех пациентов с ЭТ в большинстве полей зрения (около 95%) соответствовала степени 0. Встречались участки с MF1 (около 5%).

Дальнейшее исследование было направлено на детальное изучение патоморфологических и морфометрических особенностей мегакариоцитов.

Таблица 2

Морфометрический анализ адипоцитов костного мозга при ЭТ с учетом мутации V617F в гене *JAK2*

Группы исследованных	Количество адипоцитов в 1 мм <sup>2</sup> среза	Площадь адипоцита, мкм <sup>2</sup>
Группа сравнения	27607,8±327,7	1975,1±147,0
Пациенты с ЭТ	2398,4±301,6	2493,3±127,8*
Группа 1 ( <i>JAK2V617F</i> +)	2153,9±243,9	2418,5±173,5
Группа 2 ( <i>JAK2V617F</i> -)	2799,4±329,3	2452,4±168,0*

Выявлено, что среднее количество CD61+ позитивных элементов в 1 мм<sup>2</sup> среза (миелоидная и жировая ткань) у пациентов с ЭТ значительно выше в сравнении с таковым в норме: 9,9±2,5 и 25,2±9,1, соответственно ( $p=0,003$ ). Пациенты с мутациями в гене *JAK2* имели тенденцию к более высокому содержанию мегакариоцитов в отличие от больных группы 2: 27,1±9,3 и 20,2±7,1 в 1 мм<sup>2</sup> среза, соответственно.

При помощи компьютерных технологий и морфометрической программы определено, что размеры ядер мегакариоцитов при ЭТ вне зависимости от мутации *JAK2V617F* достоверно больше, чем в группе сравнения (табл. 3). У ряда авторов отмечено, что часть ядер клеток мегакариоцитарного ряда при ЭТ напоминает кленовые листья или рога оленя [5, 11]. В результате наших исследований выявлено, что относительное содержание таких клеток у больных составило 8,9±3,1%. У обследуемых, имевших мутацию в гене *JAK2*, число данных клеток ниже в сравнении с таковым у обследо-

Таблица 3

Морфометрическая характеристика ядра мегакариоцита при ЭТ с учетом мутации V617F в гене *JAK2*

Параметры	Группа сравнения	Пациенты с ЭТ	Группа 1 ( <i>JAK2</i> -+)	Группа 2 ( <i>JAK2</i> -)
Длина, мкм	13,9±1,3	21,1±3,3*	21,5±3,8*	20,2±2,9*
Ширина, мкм	9,4±0,9	14,2±2,8*	14,7±3,4*	13,7±1,7*
Диаметр, мкм	11,9±0,9	17,7±2,9*	18,2±3,5*	17,1±2,1*
Площадь, мкм <sup>2</sup>	90,3±16,7	191,5±74,0*	208,7±90,8*	166,8±38,5*
Коэффициент округлости	1,35±0,07	1,61±0,13*	1,58±0,14*	1,67±0,13*/**
Коэффициент компактности	0,77±0,02	0,70±0,04*	0,70±0,04*	0,69±0,04*
Критерий мультилобулярности	6,4±0,7	8,8±2,0*	9,3±2,5*	8,1±1,1*

Морфометрическая характеристика мегакариоцита при ЭТ с учетом мутации V617F в гене *JAK2*

Параметры	Группа сравнения	Пациенты с ЭТ	Группа 1 ( <i>JAK2</i> -+)	Группа 2 ( <i>JAK2</i> -)
Длина, мкм	22,2±1,6	33,4±5,0*	33,3±5,3*	33,3±5,1*
Ширина, мкм	15,6±1,3	23,4±3,7*	23,4±4,3*	23,2±3,1*
Диаметр, мкм	19,2±1,3	28,8±4,2*	28,9±4,7*	28,6±3,8*
Площадь, мкм <sup>2</sup>	261,4±40,5	589,4±184,8*	603,5±220,5*	555,7±126,3*
Коэффициент округлости	1,11±0,02	1,13±0,02*	1,13±0,02*	1,13±0,03*
Коэффициент компактности	0,87±0,02	0,88±0,25	0,87±0,32	0,89±0,11

емых без наличия генетических перестроек: 8,2±3,5% к 12,0±4,3%, соответственно (p=0,038).

С учетом того, что описательная терминология мегакариоцитов носит субъективный характер, нами применены доказательные критерии и коэффициенты, основанные на принципах математического отображения результатов. Выявлено, что коэффициенты округлости и компактности выше у больных ЭТ при сопоставлении с группой сравнения (p=0,001). Пациенты группы 2 имели более высокий коэффициент округлости в отличие от лиц с мутацией V617F в гене *JAK2* (p=0,039). При анализе отношения площади ядра к длине периметра его контура (критерий мультилобулярности) установлены различия показателей в норме и у пациентов с ЭТ (p=0,001). Значимых различий по данному параметру в зависимости от статуса гена не получено. При морфометрической оценке размера всего мегакариоцита выявлено, что такие параметры как длина, ширина, диаметр и периметр клетки выше при ЭТ в отличие от группы сравнения (p=0,0001 по отношению к каждому параметру). Достоверные различия в зависимости от генетической мутации между пациентами групп 1 и 2 не выявлены (табл. 4).

Значительная часть мегакариоцитов, представленная макроформами в виде клеток крупных и гигантских размеров, имела полиплоидные гиперсегментированные ядра со зрелой морфологией хроматина и глубокими инвагинациями, широкой цитоплазмой с интенсивно эозинофильной окраской. Относительное содержание таких элементов выше в сравнении с нормой: 81,9±11,6% к 1,9±0,1% (p=0,001). В группе пациентов с установленной мутацией в гене *JAK2* количество мегакариоцитов с крупными размерами меньше, чем у пациентов группы 2: 79,7±13,5% к 86,5±12,9%, соответственно, p=0,027. При изучении коэффициентов, дающих математическое описание формы мегакариоцита, установлены достоверные различия коэффициента округлости мегакариоцита у пациентов с ЭТ и доноров (группа сравнения) (p=0,036).

### Заключение

Установлено, что нарушения гистоархитектоники костной, жировой и гемопоэтической ткани у паци-

ентов с ЭТ имеют связь с наличием мутации в гене *JAK2*. В результате оценки морфометрических особенностей мегакариоцитопоза выявлено достоверное увеличение количества мегакариоцитов, выявлены отличительные черты локализации клеток с формированием небольших групп. Отмечено, что большинство мегакариоцитов имеет крупные размеры. Повышение частоты встречаемости макроформ и клеток с измененной (извилистой) формой контура ядра наиболее характерно для пациентов без мутации V617F в гене *JAK2*, что может быть расценено как дополнительный благоприятный морфологический признак течения заболевания. Таким образом, данные объективно отражают зависимость патоморфологических особенностей клеток от мутационного статуса V617F/*JAK2*, существенно расширяют представление о патогенетических особенностях болезни и дают дополнительную информацию для патоморфологов при анализе состояния костного мозга.

### Литература

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Удалева В.Ю., Фоминых М.С. Современные представления о диагностике и лечении эссенциальной тромбоцитемии // Вестник гематологии. 2014. Т. 10, № 1. С. 4–39. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Udaleva V.Yu., Fominykh M.S. Modern concept of diagnosis and management of essential thrombocythemia // Vestnik gematologii. 2014. V. 10, No 1. P. 4–39. (In Russ.)].
2. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues WHO Classification of Tumours, 2017. Revised 4th Edition, Volume 2. Edited by S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele.
3. Barbui T., Thiele J., Carobbio A. Guglielmelli P. et al. Discriminating between essential thrombocythemia and masked polycythemia vera in *JAK2* mutated patients // Am J Hematol. 2014;89(6):588–90.
4. Beer P.A., Erber W.N., Campbell P.J., Green A.R. How I treat essential thrombocythemia // Blood. 2011;117(5):1472–82.
5. Gisslinger H., Jeryczynski G., Gisslinger B., Wölfler A. et al. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria // Leukemia. 2016;30(5):1126–32.

6. Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Manshouri T., Thomas D. et al. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis // *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4760–6.
7. Tefferi A. How I treat myelofibrosis // *Blood.* 2011;117(3):3494–504.
8. Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka H. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel // *Blood.* 2007;110(4):1092–7.
9. Thiele J., Kvasnicka H., Müllauer L., Buxhofer-Ausch V. et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification // *Blood.* 2011;117(21):5710–8.

## **PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF BONE MARROW IN JAK2-POSITIVE ESSENTIAL THROMBOCYTEMIA**

*D.A. Diakonov, N.S. Fedorovskaya, V.A. Rosin, E.S. Fokina, E.V. Tregubova*

Essential thrombocythemia is a Ph-negative chronic myeloproliferative disease. It is characterized by predominant megakaryocytic proliferation in the bone marrow. In most cases, the *JAK2* (V617F) point mutation leading to transformation of hemopoietic cells may be detected. To verify the diagnosis, certain diagnostic criteria have been developed. Special attention is paid to the histological examination of the bone marrow using trephine biopsies. Molecular genetic analysis is also necessary to detect the mutations disturbing the proliferation of megakaryocytic cells. However, the interrelations between pathology of the bone marrow with *JAK2* status and the presence of V617F mutation in essential thrombocythemia were not defined. The aim of our study was to study hematopoiesis, pathological and morphological features of the megakaryocytic cells depending on *JAK2* (V617F) mutation in trephine biopsies of bone marrow. Histological and morphometric methods were used. It was found that the disturbances of histoarchitectonics manifested by bone and fat tissue were definitely related to the presence of V617F mutation in *JAK2* gene. The enhanced bone formation was shown in patients with unchanged mutation status. Abnormalities of adipocytes were more characteristic of patients without *JAK2* (V617F) mutation. More abundant megakaryocytes per 1mm<sup>2</sup> compared with the norm were observed in all subjects. It was found that megakaryocytic cells in patients with essential thrombocythemia were featured by formation of loose clusters. Patients without genetic anomalies typically exhibited the increased relative number of macro-megakaryocytes with mature morphology and winding contours of nuclei. In general, the obtained data show that the presence of the mutation in *JAK2* gene determines the pathomorphological features of myelopoiesis and megakaryocytic cells. The results extend the understanding of the characteristics of pathological process and provide additional information for pathomorphologists.

*Key words:* essential thrombocythemia, megakaryocytes, histology, bone marrow

### **Информация об авторах**

Дьяконов Дмитрий Андреевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72. E-mail: DiakonovDA@rambler.ru

Федоровская Надежда Станиславовна – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории патоморфологии крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72.

Росин Виталий Анатольевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72.

Фокина Елена Сергеевна – кандидат медицинских наук, врач-гематолог клинко-диагностического отделения гематологии и химиотерапии Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72.

Трегубова Екатерина Владимировна – лаборант-исследователь лаборатории молекулярно-генетического анализа Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72.

Контакты: Дьяконов Дмитрий Андреевич. Телефон +7 (912) 828 6483. E-mail: DiakonovDA@rambler.ru

*Материал поступил в редакцию 21 декабря 2017 года*

# ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНАЯ КАРЦИНОМА. ОПИСАНИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

**Б.Б. Бантыш**

ФГБУ ВО «Тульский государственный университет», ГУЗ ТО «Тульская областная клиническая больница», Тула

Внутриопухолевая гетерогенность клеточных элементов при раке почки может делать весьма полиморфной гистологическую картину опухоли, что затрудняет ее морфологическую диагностику. В ряде случаев постановка правильного диагноза невозможна без использования дополнительных методов верификации. В данной работе описано клиническое наблюдение светлоклеточной почечно-клеточной карциномы у пациента 61 года с нетипичной морфологической структурой. Правильный патогистологический диагноз поставлен с помощью иммуногистохимического метода.

*Ключевые слова:* почечно-клеточная карцинома, иммуногистохимическое исследование, внутриопухолевая гетерогенность

Эпителиальные опухоли почки являются наиболее многочисленной из гетерогенной группы новообразований этого органа [4]. Под термином «рак почки» принято подразумевать так называемые почечно-клеточные карциномы (ПКК; renal cell carcinoma – RCC), происходящие из клеток паренхимы почки. Почечно-клеточные карциномы составляют примерно 3% от всех онкологических заболеваний у взрослых. Встречаемость ПКК возрастает примерно на 2,5% ежегодно. Увеличение показателя заболеваемости ПКК отчасти связано с широким внедрением инструментальных методов исследования – ультразвуковой диагностики, компьютерной томографии, ядерно-магнитного резонанса, позволяющих обнаруживать небольшие бессимптомные новообразования. В то же время частота запущенных форм ПКК также продолжает увеличиваться, что указывает на существование истинного прироста заболеваемости [1]. Наибольшая частота ПКК отмечается в странах Северной Америки и Скандинавии. Редко встречаются эти опухоли в странах Южной Америки и Африки [10]. Мужчины болеют ПКК примерно в 2 раза чаще, чем женщины. Пик заболеваемости приходится на возраст 50–70 лет. При наследственных (семейных) опухолях, связанных с онкологическими синдромами, ПКК могут возникать существенно раньше, зачастую у людей моложе 40 лет [9]. Развитие наследственных новообразований почек обусловлено в первую очередь герминальными наследственными мутациями [4]. При сравнении показателей заболеваемости ПКК в Европе отмечается, что в одних странах заболеваемость в 5 раз выше, чем в других. Так, в Сербии этот показатель равен 2,9 на 100 000 населения в год, тогда как для Чехии он составляет 15,2. Даже внутри страны показатели могут отличаться по районам, например в Салерно в южной Италии заболеваемость ПКК составляет 3,6 на 100 000 населения

в год, а на северо-востоке она равна 9,0 [10]. Причины такого разнообразия пока не установлены.

Для гистологической верификации ПКК патоморфологи изучают биопсийный и операционный материал, окрашенный гематоксилином и эозином. При этом клинико-морфологические наблюдения позволили заметить, что по мере роста новообразования неопластические процессы в опухоли способны настолько изменить структуры клетки, что морфологически и фенотипически клетки перестают быть похожими на свою клетку-предшественницу, поскольку в одной опухоли могут встречаться различные типы клеток: сочетание светлых и зернистых или смесь светлых и хромофильных.

Приблизительно у одной трети впервые выявленных пациентов с раком почки имеются метастазы. Наиболее частые зоны метастазирования – легкие, кости, надпочечники, печень и головной мозг. Главная клиническая проблема, стоящая перед онкологами и урологами, заключается в том, что метастазы рака почки устойчивы к химио- и лучевой терапии, а также иммунотерапии [1].

Не вызывает сомнений, что возникновение и прогрессирование злокачественных опухолей, в том числе ПКК, находится под контролем измененных генов. В злокачественных новообразованиях с течением времени происходят разнообразные генетические изменения [12]. При этом постоянно возникают клеточные клоны с новыми свойствами, и возрастающая генетическая неустойчивость увеличивает прогрессию опухоли [15].

Для карцином почки характерен продолжительный доклинический период, который несомненно увеличивает вероятность клонального развития. По данным разных авторов, гетерогенность при ПКК выявлена в диапазоне от 29% [13] до 71% [8] исследованных опухолей почек.

Прямая зависимость между размером новообразования и клональной гетерогенностью ПКК не уста-

новлена. Так, Y. Shichikura et al. показали наличие гетерогенности ПКК при среднем наибольшем размере 18 мм [14]. В то же время Н. Nenning et al. подобную закономерность не выявили, опухоли размером более 2,5 см не содержали гетерогенных популяций [12]. Что касается взаимосвязи между степенью анаплазии и гетерогенностью опухоли, по данным J.L. Ruiz-Cerdá et al. [13], внутриопухолевая гетерогенность не была взаимосвязана со степенью злокачественности ПКК: гетерогенность опухолевых клонов определяли как в высокодифференцированных (GI), так и в умеренно- (GII) и низкодифференцированных (GIII) ПКК [12].

Прогностическое значение внутриопухолевой гетерогенности при ПКК изучено мало. Исследователи описали ее существование, но не показали, определяет ли она биологическое поведение опухоли. В исследовании Н. Al-Abadi et al., в которое входили 112 пациентов с ПКР, было показано, что при гетерогенности в опухоли больные чаще имели метастазы и умирали раньше, чем пациенты с опухолями, в которых отсутствовала гетерогенность [5].

### Клиническое наблюдение

Пациент В., 61 год, находился на лечении в урологическом отделении Тульской областной клинической больницы с диагнозом «рак почки». Жалобы при поступлении не предъявлял. Заболевание диагностировано при обследовании в районной больнице по поводу гематурии, когда была выявлена опухоль в нижнем сегменте правой почки. Диагноз подтвержден данными рентгеновской компьютерной томографии. Произведена нефрэктомия.

При макроскопическом исследовании операционного материала опухоль желто-серого цвета, размеры 6,5×6×6 см, без прорастания в капсулу почки и стенку лоханки. При микроскопическом исследовании новообразование представлено тубулярными структурами из мелких катаплазированных клеток с округлыми и овальными ядрами, содержащими грубодисперсный хроматин и ядрышки, и солидными участками из веретенообразных клеток с хорошо выраженным инфильтрирующим ростом в окружающую почечную ткань, на границе опухоли лимфоплазмозитарная инфильтрация, в толще опухоли – некрозы (рис. 1). В паранефральной жировой клетчатке почечного синуса, фиброзной капсуле, лоханке, краях резекции, удаленных регионарных лимфатических узлах опухолевые клетки не обнаружены.

Предварительное патогистологическое заключение: морфологическая картина карциномы – злокачественной эпителиальной опухоли почки G3 (3-я степень злокачественности по Фурману). Дифференциальная диагностика проводилась между низкодифференцированными вариантами эпителиальных опухолей почки, прежде всего светлоклеточной ПКК и карциномой собирательных трубочек (протоков Беллини).

Особенность данного случая заключается в нетипичной морфологической картине исследованно-

го новообразования. Для протокового рака Беллини (carcinoma of the collecting ducts of Bellini, индекс ICD-O 8319/3), признанного в мире самым редким типом ПКК, характерны тубулярные или тубулярно-папиллярные эпителиальные структуры с выраженной десмопластической реакцией стромы. Кроме того, могут встречаться участки солидного роста, папиллярного строения, микрокисты, веретеноклеточный компонент. Вблизи опухоли обычно располагается очаг хронического воспаления. В большинстве случаев рак диагностируется у мужчин и характеризуется агрессивным течением. Чаще встречается метастатическое поражение лимфатических узлов, легких, костей, чем поражения печени. Клинически отмечаются гематурия и боли в области живота [4, 10, 11]. Обычно клетки этого варианта почечно-клеточного рака имеют признаки высокой злокачественности (3–4-я степень злокачественности по Фурману). Типичные карциномы из собирательных трубочек отличаются множественными метастазами на момент постановки диагноза с плохим прогнозом [10]. В исследуемом случае морфологическая картина опухоли и клинические симптомы были очень похожи на карциному Беллини.

Этот вариант рака имеет типичный иммуногистохимический профиль: опухоль экспрессирует общий цитокератин AE1/AE3, LMW CK, 34βE12 и CK19, ЕМА, виментин, агглютинин улитки (UEA-1) и лектин арахиса [7].

Светлоклеточная карцинома (clear cell carcinoma, 8310/3) – злокачественная опухоль, состоящая из клеток со светлой или эозинофильной цитоплазмой, расположенных в тонкой сосудистой сети. На долю

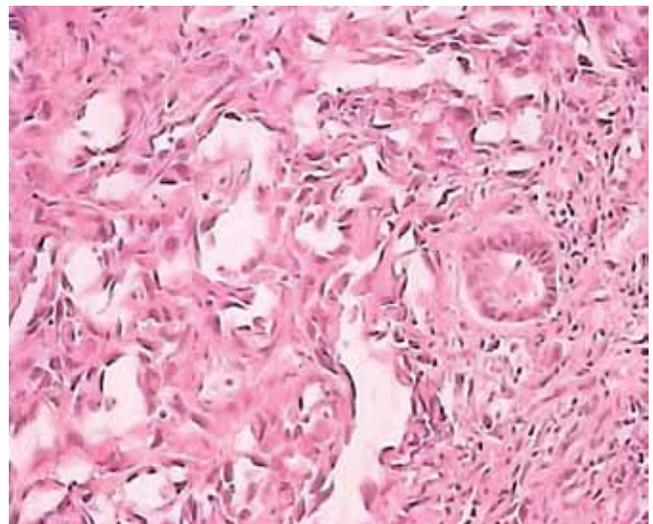


Рис. 1. Опухоль представлена тубулярными структурами из мелких катаплазированных клеток с округлыми и овальными ядрами, содержащими грубодисперсный хроматин и ядрышки, и солидными участками из веретенообразных клеток с хорошо выраженным инфильтрирующим ростом в окружающую почечную ткань. Окраска гематоксилином и эозином. ×200

светлоклеточного варианта приходится 70–75% всех случаев ПКК и 60–62% эпителиальных опухолей почек [3]. Раньше считалось, что светлоклеточные ПКК берут происхождение из надпочечников, поэтому данную категорию новообразований называли гипернефромами. В настоящее время предполагается, что светлоклеточные ПКК возникают из проксимальных отделов почечных канальцев [1–3]. Варианты роста светлоклеточного почечно-клеточного рака могут вызывать сложности в дифференциальной диагностике. В опухоли выявляют солидный компонент, псевдососочковые структуры, участки саркоматоидной или рабдоидной дифференцировки [4].

При светлоклеточной ПКК обычно наблюдается положительная реакция с CD10, CK18, PCK, AE1/AE3, эпителиальным мембранным антигеном

(EMA) и виментином, но отрицательная реакция с СК7, СК19, СК20, 34βE12, раково-эмбриональным антигеном (CEA), S-100, HMB-45 и ингибином [6].

Для уточнения гистогенеза исследуемого новообразования проведено фенотипирование. Получены следующие результаты: CD10 – слабо позитивная реакция в опухолевых клетках (рис. 2), виментин и панцитокератин – выраженная диффузная позитивная реакция (рис. 3, 4), цитокератин 19 – негативная реакция (рис. 5).

В описанном наблюдении вызвала сомнение слабая экспрессия в опухолевых клетках антитела CD10, однако негативная реакция на цитокератин 19 полностью исключила диагноз карциномы из собирательных трубочек. Таким образом, на основании морфологического и иммуногистохимического исследования уста-

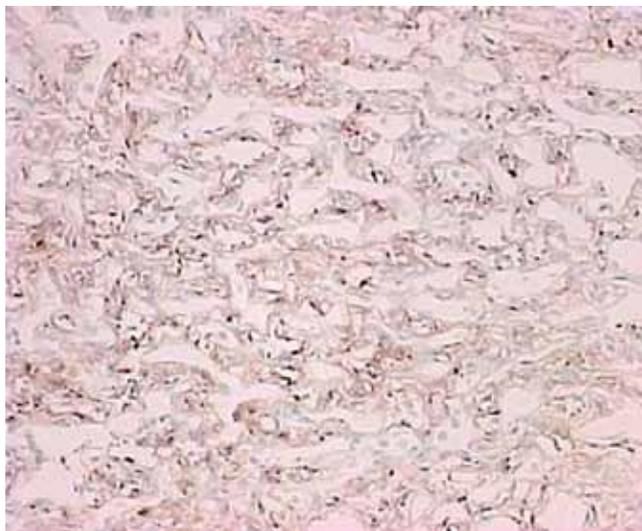


Рис. 2. Слабо выраженная мембранная экспрессия CD10 в клетках опухоли. Иммунопероксидазный метод.  $\times 200$

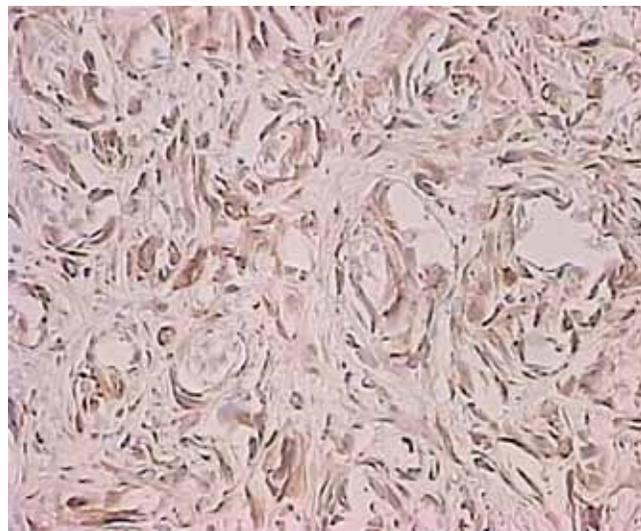


Рис. 3. Выраженная цитоплазматическая экспрессия виментина в клетках опухоли. Иммунопероксидазный метод.  $\times 200$

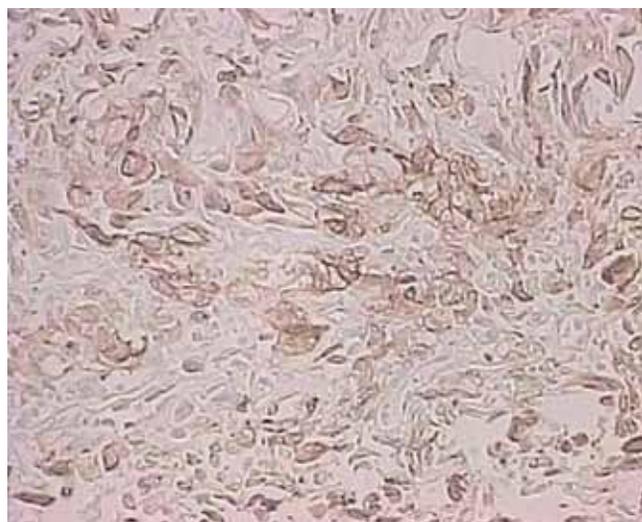


Рис. 4. Выраженная экспрессия панцитокератина в клетках опухоли. Иммунопероксидазный метод.  $\times 200$

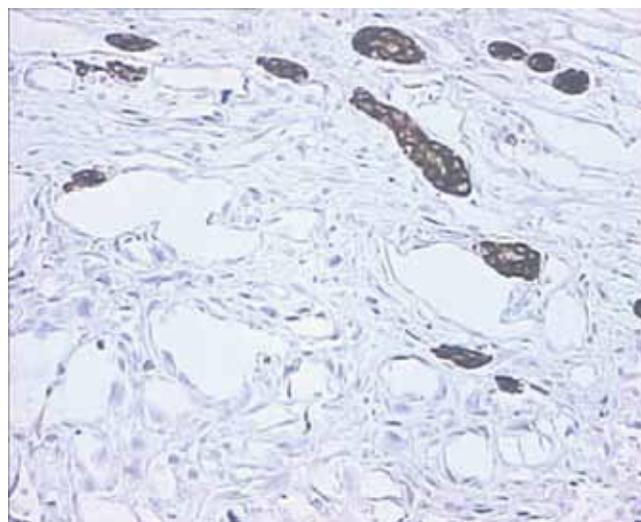


Рис. 5. Негативная реакция на цитокератин 19 в клетках опухоли. Иммунопероксидазный метод.  $\times 200$

новлен фенотип светлоклеточной почечно-клеточной карциномы G3 по Фурману.

### Заключение

Значительная морфологическая гетерогенность почечно-клеточной карциномы в описанном случае, изменение фенотипических признаков опухоли позволяют предположить, что данные особенности являются результатом патологической эволюции клеток новообразования, формируя индивидуальное развитие опухоли почки. Возможно, это свидетельствует о происходящей в новообразовании селекции с формированием опухолевых клонов, обладающих высоким метастатическим потенциалом. Напрашивается вывод, что биопсия и фенотипирование выявленных опухолей, в том числе рецидивов и метастазов, должны включаться как обязательный этап в стандарты лечения пациентов онкологического профиля с целью коррекции терапии.

### Литература

1. Веллев Е.И., Богданов А.Б. Особенности метастазирования рака почки, хирургическое лечение рецидивов и метастазов // Практическая онкология. 2005. Т. 6. № 3. С. 167–171. [Vellev E.I., Bogdanov A.B. Osobennosti metastazirovaniya raka pochki, hirurgicheskoe lechenie recidivov i metastazov // Prakticheskaya onkologiya. 2005. V. 6. No 3. P. 167–171 (In Russ.)].
2. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: МАПО, 2007. 211 с. [Imyanitov E.N., Khanson K.P. Molekulyarnaya onkologiya: klinicheskie aspekty. SPb.: MAPO, 2007. 211 p. (In Russ.)].
3. Пасечник Д.Г. Современные представления о гистологической классификации рака почки // Архив патологии. 2001. Т. 6. С. 50–55. [Pasechnik D.G. Sovremennye predstavleniya o gistologicheskoy klassifikacii raka pochki // Arkhiv patologii. 2001. V. 6. P. 50–55. (In Russ.)].
4. Франк Г.А., Андреева Ю.Ю. Опухоли почки. Морфологическая диагностика и генетика: Руководство. М.: РМАПО, 2011. 66 с. [Frank G.A., Andreeva Yu.Yu. Opuholi pochki. Morfologicheskaya diagnostika i genetika: Manual // M.: RMAPO. 2011. 66 p. (In Russ.)].
5. Al-Abadi H., Nagel R. Renal cell carcinoma: DNA cytometry and its clinical significance. An 8 year survival study // *Helv Chir Acta*. 1991;58:331–4.
6. Crotty T.B., Farrow G.M., Lieber M.M. Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases // *J Urol*. 1995;154:964–7.
7. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, 2006. 848 p.
8. Krech R.H., Baretton G., Fonatsch C., Fruchtnicht W., Lohrs U. Comparison of flow cytometric, static cytometry and tumor cytogenetic investigation results human renal cell carcinomas // *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1990;74:228–32.
9. Martel C.L., Lara P.N. Renal cell carcinoma: current status and future directions // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;45:177–90.
10. Martínez-Salamanca J.I. Modelo predictivo para la supervivencia y la mortalidad perioperatoria en pacientes con carcinoma renal y extensión venosa tumoral (estudio internacional multi-institucional) // Tesis doctoral 2011, página: 19, 32, 34.
11. Murphy W.M., Grignon D.J., Perlman E.J. Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures // *Atlas of Tumor Path. 4-rd Ser.*, Fasc. 1. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 2004. P. 101–240.
12. Nanning H., Rassler J., Minh D.H. Heterogeneity of DNA distribution 127 pattern in renal tumours // *Anal Cell Pathol*. 1997;14:9–17.
13. Ruiz-Cerdá J.L., Hernández M., Sempere A., O'Connor J.E., Kimler B.F., Jiménez-Cruz F. Intratumoral heterogeneity of DNA content in renal cell carcinoma and its prognostic significance // *Cancer*. 1999;86:664–71.
14. Shishikura Y., Suzuki M. Clinicopathologic study of 97 cases of small renal cell carcinomas using DNA flow cytometric analyses // *Pathol Int*. 1996;46:947–52.
15. Shlush L.I. et al. Clonal evolution models of tumor heterogeneity // *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:662–5.

## RENAL CELL CARCINOMA. CASE REPORT

### B.B. Bantysh

Intratumoral heterogeneity of cellular elements in kidney cancer results in polymorphic histological picture making morphological diagnostics difficult. In some cases, the establishing of the correct diagnosis is impossible without the use of additional verification methods. In this paper, a clinical observation of clear-cell renal cell carcinoma in a 61-year-old patient with an atypical morphological structure is described. The correct pathohistological diagnosis was made using the immunohistochemical method.

*Key words:* renal cell carcinoma, immunohistochemical examination, intratumoral heterogeneity

### Информация об авторе

Бантыш Борис Борисович – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения Тульской областной клинической больницы, доцент кафедры общей патологии Медицинского института Тульского государственного университета. Адрес: 300012, Тула, пр-т Ленина, д. 92. E-mail: b.bantysh@gmail.com

Материал поступил в редакцию 20 июня 2017 года

# ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИОГЕНЕЗА В ПРЕПИРИФОРМНОЙ КОРЕ ЧЕЛОВЕКА В РАННЕМ ФЕТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

А.С. Харламова<sup>1</sup>, О.С. Годовалова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

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

Целью работы является сравнительная характеристика динамики глиогенеза в древней коре на ранних этапах фетального периода онтогенеза человека. Препириформная кора (часть палеокортекса, филогенетически наиболее древний участок плаща, связанный с обработкой обонятельной информации) – наименее изученная область коры человека. Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека на 8–19-й неделях гестации с использованием глиальных маркеров (Olig-2, GFAP, MBP). В сравнительных целях были использованы аутопсии плодов на 26–34-й неделях развития. Мы показали, что в раннем плодном периоде развития (10–13-я недели) динамика развития корковых компонентов, по-видимому, определяется прежде всего источниками миграции нейробластов, а позже собственным темпом развития соответствующих территорий и их афферентов. Анализ Olig-2 и GFAP-препаратов свидетельствует о более раннем начале глиальной дифференцировки и созревания препириформной коры по сравнению с переходной инсулярной зоной и ведущем развитии маргинального (I) слоя коры. В период между 13,5–15,5-й неделями развития нарастает абсолютное количество Olig-2 нейробластов препириформной коры. Период между 15–17-й неделями гестации является критическим для формирования GFAP-иммунореактивных элементов препириформной зоны. MBP-иммунореактивность в пределах корковых структур впервые выявлена на 30-й неделе развития: первым миелинизации в процессе развития коры подвергается латеральный обонятельный тракт.

*Ключевые слова:* палеокортекс, плоды человека, пренатальное развитие, глиальная дифференцировка, Olig-2, GFAP, MBP

Кора переднего мозга человека состоит из трех основных территорий – новой, старой и древней коры и переходных (межуточных) зон между ними. Палеокортекс – филогенетически наиболее древняя часть плаща, связанная прежде всего с обработкой обонятельной информации [1]. Обонятельные афференты получают следующие структуры палеокортекса приматов – обонятельный бугорок (макроанатомически – *substantiae perforatae anterioris*), препириформная кора (*cortex prepiriformis* (фронтальная препириформная кора), макроанатомически – *gyrus olfactorius lateralis*), периамигдаллярная кора (частично височная препириформная кора и корковое ядро миндалина в англоязычной терминологии [3], макроанатомически – *g. semilunaris*). Диагональную область и *septum pellucidum* также могут относить к палеокортикальным образованиям [1].

Обонятельная система приматов вызывает интерес в основном благодаря гипотезе о постнатальном нейрогенезе млекопитающих [8]. Палеокортикальные центры так называемого обонятельного мозга меньше изучены по сравнению с ядрами амигдаллярного комплекса, третичными центрами старой (гиппокампальной) и переходной коры (энториальной областью,

*g. parahippocampalis*). Есть ряд современных работ, посвященных незрелым нейронам в составе пириформной коры взрослых млекопитающих [5]. Подавляющее число работ относительно корковых обонятельных центров выполнено на модельных видах. При этом вопросы, связанные с пренатальным онтогенезом палеокортекса, остаются недостаточно исследованными даже на материале лабораторных животных [15]. Прицельное изучение морфогенеза структур палеокортекса человека фактически не проводилось с середины прошлого века, поэтому большая часть данных о созревании корковых обонятельных структур получена с помощью классических гистологических методов [3, 4, 6, 9].

В составе древней коры выделяют три слоя – I маргинальный (MZ) краевой слой, II гранулярный (внешний пирамидный) слой, III слой полиморфных клеток. Наиболее характерного строения у человека трехслойная структура достигает в пределах основных полей препириформной коры. Вторичные обонятельные волокна проходят в составе латерального обонятельного тракта (LOT), лежащего в маргинальном слое препириформной коры, его волокна образуют синапсы с отростками внешних и внутренних пирамидных кле-

ток препириформной коры [12]. Палеокортикальная пластинка характеризуется неполным отделением от перивентрикулярных клеточных масс. II слой палеокортикальной коры имеет характерное строение, сохраняющееся на всех этапах онтогенеза (густоклеточные скопления образуют своеобразные отрезки-кластеры разного размера в пределах второго слоя) [1].

Островковая (инсулярная) кора – переходная зона коры (периопалеокортекс) между древней и новой корой. На ранних стадиях онтогенеза инсулярная зона также имеет характерное строение: кортикальная пластинка новой коры клинообразно сужается в направлении древней коры в пределах инсулярного поля  $ii_1$ , редкоструктурное поле  $ii_0$  фактически отделяет корковую пластинку инсулярной коры от препириформной области древней коры [1].

Данная работа является частью исследования гетерохроний развития корковых структур человека на пренатальном этапе онтогенеза. Основная цель работы – сравнительная характеристика динамики глиогенеза в древней коре на ранних этапах фетального периода онтогенеза человека.

В настоящее время существует хорошо зарекомендовавшая себя практика использования различных иммуногистохимических маркеров для оценки динамики созревания нервной ткани, в том числе участков головного мозга млекопитающих [16]. Объединение подобного иммуногистохимического подхода с классическим макроморфологическим и цитоархитектоническим анализом участков развивающегося мозга дает возможность наиболее полно охарактеризовать глиальную и невральную дифференцировку на разных стадиях развития и составить общее представление о ходе созревания головного мозга человека.

Для оценки глиальной дифференцировки широко используют антитела к глиальному кислому фибриллярному белку (GFAP) – маркеру астроцитарной глии [11]. Зрелость проводящих путей мозга характеризуется степенью миелинизации волокон, за которую отвечает олигодендроглия. Антитела к основному белку миелина (MBP) используют как для определения миелинизации нервных волокон, так и для оценки зрелости олигодендроцитов [14]. В последние годы в нейробиологии развития интенсивно используются маркеры транскрипционных факторов различных линий дифференцировки нейробластов. Olig-2 – фактор транскрипции клеток линии олигодендроглии центральной нервной системы – синтезируется задолго до появления характерной цитоморфологии олигодендроцита и других маркеров зрелой олигодендроглии, включая основной белок миелина [18]. Предполагается, что фактор Olig-2 критичен для ранних стадий дифференцировки нейробластов линии олигодендроглии [13]. Факторы семейства Olig участвуют в процессах дифференцировки в пренатальном онтогенезе, нормальной регенерации у взрослых млекопитающих и патогенетическом развитии глиом, однако механизмы их влияния не до конца понятны [17].

## Материалы и методы

Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека на 8–19-й неделях гестации из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека (20 случаев). Для сравнения использовали аутопсии плодов на 26–34-й неделях развития и новорожденных (10 случаев). Гестационный возраст определяли на основе патологоанатомических протоколов и истории болезни (данные ультразвуковых исследований, акушерский срок) с контролем по весо-размерным характеристикам плода (табл.). Фиксация материала осуществлялась в 10% забуференном формалине (фосфатный буфер, pH 7,2–7,4) либо в жидкости Буэна (хранение в 70% спирте). Для исследования брали полушарие мозга. Изготавливали серийные парафиновые срезы (10 мкм) и проводили рутинное гистологическое исследование (окраска по Маллори, крезил-фиолетовым по Нисслю). Всего мы обработали материал от 31 плода на разных сроках гестации, для иммуногистохимического исследования было отобрано 18 аутопсий (табл.).

Иммуногистохимические исследования проводили согласно стандартному протоколу для системы визуализации иммунопероксидазных реакций Ultra Vision LP

Таблица

Поло-возрастной состав и морфометрические показатели использованного материала

№	Пол	Возраст, неделя	Фиксация	Масса, г	Рост/КТР*, мм
1	–	8	Формалин	–	23,5 КТР
2	–	10,5	Формалин	–	59 КТР
3	–	11	Формалин	–	48 КТР (БПР-21)
4	–	13,5	Формалин	28	80 КТР
5	М	14	Формалин	60	100 КТР (140)
6	Ж	15	Формалин	89	107 КТР (162)
7	–	16	Формалин	127	138 КТР
8	–	17	Формалин	142	145 КТР
9	Ж	18	Формалин	179	148 КТР
10	М	18,5	Формалин	175	190
11	М	19	Формалин	240	200
12	Ж	26	Жидкость Буэна	730	310
13	Ж	27	Формалин	690	330
14	М	30	Формалин	1250	370
15	М	30,5	Формалин	1800	390
16	М	34,5	Жидкость Буэна	3670	510
17	Ж	38	Формалин	3100	500
18	Ж	40	Формалин	2760	530

\* КТР – копчиково-теменной размер

Detection System HRP Polymer (LabVision, Thermosci) с температурным демаскированием антигенов в цитратном буфере (pH 5,9–6,0). Иммунофлуоресцентная метка выполнена с антителами второго этажа серии Superclonal™ (1:400–1:800, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor с температурным демаскированием антигенов в цитратном буфере (pH 5,9–6,0), Alexa Fluor 488, Invitrogen, Thermosci). Для каждого опыта ставился негативный контроль.

В качестве антител первого этажа использовали анти-GFAP (1:100–1:200, monomouse, Neomarkers (LabVision, Thermosci), –Olig-2 (1:4000, monomouse (Sigma-Aldrich), –MBP (1:200–1:400, polyrabbit, NeoMarkers (LabVision, Thermosci).

Измеряли следующие морфометрические показатели: общая плотность клеток, плотность Olig-2 иммунореактивных нейроblastов, плотность иммунореактивных элементов, относительная плотность Olig-2 иммунореактивных нейроblastов. Все измерения проводили на микрофотографиях серийных срезов с использованием микроскопов Leica DM2500, объектив  $\times 40$  (Германия), Lomo TCA-9.0C, Micro-View (Россия). Для каждого случая обрабатывали 10 неперекрывающихся полей зрения. В качестве области интереса выбирали фрагмент  $50 \times 200$  мкм ( $0,01$  мм<sup>2</sup>), исключая сосуды и другие очевидные артефакты. В области интереса подсчитывали общее количество клеток, количество Olig-2 иммунореактивных нейроblastов и определяли плотность иммуноактивных элементов в области интереса (ИП). Плотность клеток подсчитывали вручную. Для контроля ручных измерений ИП измеряли при помощи программных алгоритмов ImageJ. Относительную плотность Olig-2 иммунореактивных нейроblastов вычисляли как отношение иммунопозитивных клеток к общему числу клеток в области интереса. Статистический анализ полученных данных (непараметрические тесты – дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса и тест Манна–Уитни для двух выборок,  $p < 0,05$ ) проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatsoftInc., Tulsa, OK, США).

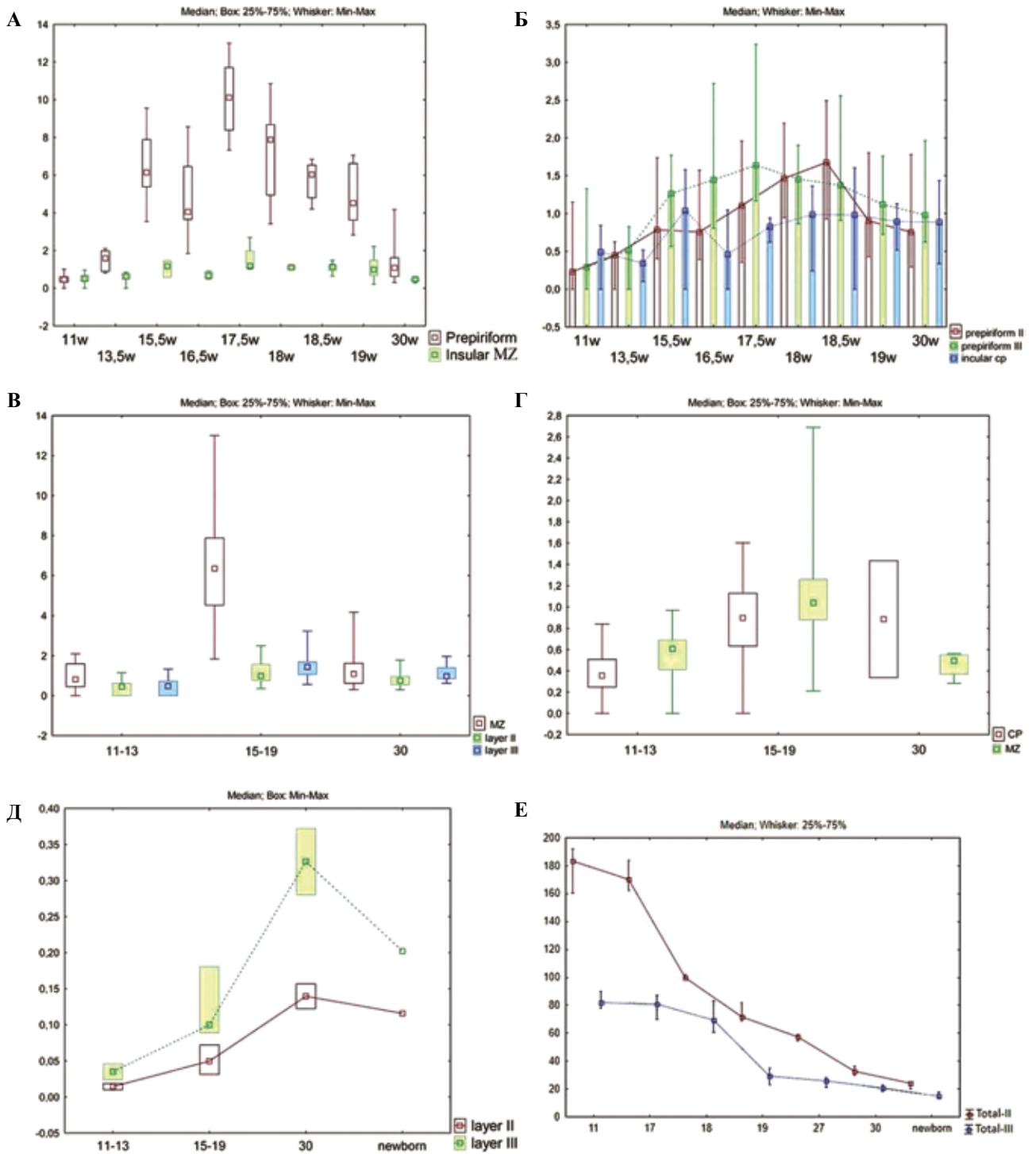
## Результаты и обсуждение

На 8-й неделе развития в палеокортикальной зоне корковая пластинка еще не дифференцирована, граница с переходной корой легко определяется за счет расширения корковой пластинки в зоне зачатка инсुлярной коры, неокортикальная пластинка на этом сроке формируется в области латеральных стенок полушария. Палеокортикальная пластинка с выраженным густоклеточным вторым слоем сформирована на 10–11-й неделе развития, в составе препириформной коры можно выделить маргинальный слой (I), собственно палеокортикальные гранулярный (II) и полиморфный (III) слои. Последний слабо отделен от R-зоны с мигрирующими нейроblastами. На ранних фетальных сроках развития клетки в пределах II слоя расположены очень компактно, III слой также демонстрирует более плотное рас-

положение клеток по сравнению с поздними сроками. Плотность клеток в пределах II и III слоев уменьшается после 18-й недели гестации (рис. 1 E), в то время как характерная кластерная организация II слоя сохраняется на всех этапах онтогенеза. Нейроны с хорошо заметной цитоплазмой пирамидной цитоморфологии появляются в пределах II и III слоев к 19-й неделе развития. На 30-й неделе развития цитоархитектонически и по показателю общей плотности в пределах II и III слоев препириформная кора приближается к состоянию при рождении.

Слабая Olig-2 иммунореактивность у плода на 8-й неделе развития выявляется в области медиального и латерального ганглиозных бугров. На 10–11-й неделе развития плотное скопление Olig-2 иммунореактивных клеток демонстрируют медиальный, латеральный ганглиозный бугры и вентрикулярный слой септальной зоны. Более редкие Olig-2 иммунопозитивные нейроblastы расположены в промежуточной зоне латерального неокортекса, собственно корковая пластинка латерального неокортекса остается практически свободной от Olig-2 иммунореактивных нейроblastов, отдельные Olig-2 иммунопозитивные клетки располагаются в маргинальном слое этой области. Дорсальный неокортекс на этих сроках остается свободным от Olig-2 иммунореактивных элементов, что подтверждает гипотезу о происхождении прогениторных клеток олигодендроглии из латерального ганглиозного бугра и их последующую миграцию в неокортекс в ранне- и среднефетальном периоде (11–23-я недели) [13]. От латерального ганглиозного бугра Olig-2 иммунореактивные нейроblastы также распространяются в вентральном направлении вдоль и снаружи от развивающейся ограда (*claustrum*). Olig-2 нейроblastы на этих сроках демонстрируют, таким образом, зона миграции инсулярной коры и R-зона палеокортекса, единичные Olig-2 клетки обнаруживаются в пределах корковой пластинки и в маргинальной зоне. Позже у плода на 13-й неделе развития Olig-2 иммунореактивность проявляет также вентрикулярный слой так называемого палеокортикального желудочка. Вопрос о дальнейшей судьбе этих Olig-2 клеток-предшественников в онтогенезе остается открытым и требует дальнейших исследований. В литературе есть сведения о том, что по крайней мере часть клеток Кахалия–Ретциуса палеокортикальной коры может мигрировать из палеокортикального желудочка [10]. Вопрос об однородности различных частей палеокортекса (поля обонятельного бугорка, препириформной и периамигдаллярной коры) в отношении источников нейроblastов, в том числе Olig-2 иммунореактивных, остается открытым.

Морфометрические показатели плотности Olig-2 нейроblastов и ИП в зависимости от срока плода изменяются сходным образом. Плотность Olig-2 нейроblastов и ИП препириформной коры возрастают к 15-й неделе развития, что особенно заметно в пределах маргинального слоя (рис. 1 A, B). На 15–19-й неделе развития маргинальная зона препириформной коры демонстрирует статистически значимое увеличение



*Рис. 1.* Морфометрические показатели. А – Плотность иммунореактивных элементов (ИП) маргинального слоя препириформной и инсулярной коры в реакции с антителами к Olig-2. Б – ИП палеокортикальной пластинки (слоев I и II) и корковой пластинки инсулярной коры. В – ИП трехслойной препириформной коры (MZ – маргинальный (I) слой, II, III). Г – ИП инсулярной коры (CP – корковая пластинка). Д – Относительная плотность Olig-2 иммунореактивных нейробластов в пределах II и III слоев препириформной коры. Е – Общая плотность клеток II и III слоев препириформной коры

количества Olig-2 нейробластов. В позднем фетальном периоде эти показатели в пределах маргинального слоя значимо ниже (рис. 1 А). III слой препириформной коры демонстрирует резкий рост показателей уже на 15-й неделе развития, что может быть связано с неполным отделением этого слоя препириформной коры от R-зоны миграции нейробластов. Показатели плотности Olig-2 иммунореактивных нейробластов и ИП II слоя препириформной коры достигают значений, характерных для III слоя, к 17-й неделе развития. На 17–19-й неделях оба показателя плотности достоверно выше, чем в корковом слое инсулярной коры (рис. 1 Б). С учетом того, что общая плотность клеток на 11–17-й неделях развития значимо не меняется, по-видимому, это увеличение показателей плотности Olig-2 иммунореактивных клеток и ИП отражает повышение абсолютного количества Olig-2 нейробластов в пределах палеокортикальной пластинки между 13-й и 15-й неделями развития. II слой препириформной коры демонстрирует тенденцию к снижению показателей плотности после 19-й недели гестации, эти показатели в пределах III слоя значимо не изменяются в среднем и позднем фетальном периодах развития. Инсулярная кора демонстрирует постепенный рост показателя плотности Olig-2 иммунореактивных нейробластов

и ИП, но не такой выраженный в маргинальном слое, как в случае палеокортикальной зоны (рис. 1 А, Г, рис. 2). Показатели плотности маргинального слоя препириформной коры достоверно выше, чем в маргинальном слое инсулярной коры (рис. 1 А). Показатели плотности в пределах маргинального слоя несколько ниже на 30-й неделе развития и позже в инсулярной коре. Показатели в пределах корковой пластинки инсулярной коры значимо не отличаются. Динамика изменения показателей плотности во II слое препириформной коры и корковой пластинке инсулярной коры имеет сходную динамику, хотя они выше в препириформной коре на 17–19-й неделях развития. Снижение показателей плотности в маргинальном слое препириформной (как и инсулярной) коры к 30-й неделе развития может быть связано с активными процессами роста в среднем фетальном периоде. Показатели плотности в пределах клеточных слоев препириформной коры сильно не изменяются к позднему фетальному периоду, что на фоне снижения общей плотности клеток может косвенно свидетельствовать о более позднем начале активной фазы олигодендрогенеза в пределах собственно палеокортикальной пластинки по сравнению с маргинальной областью.

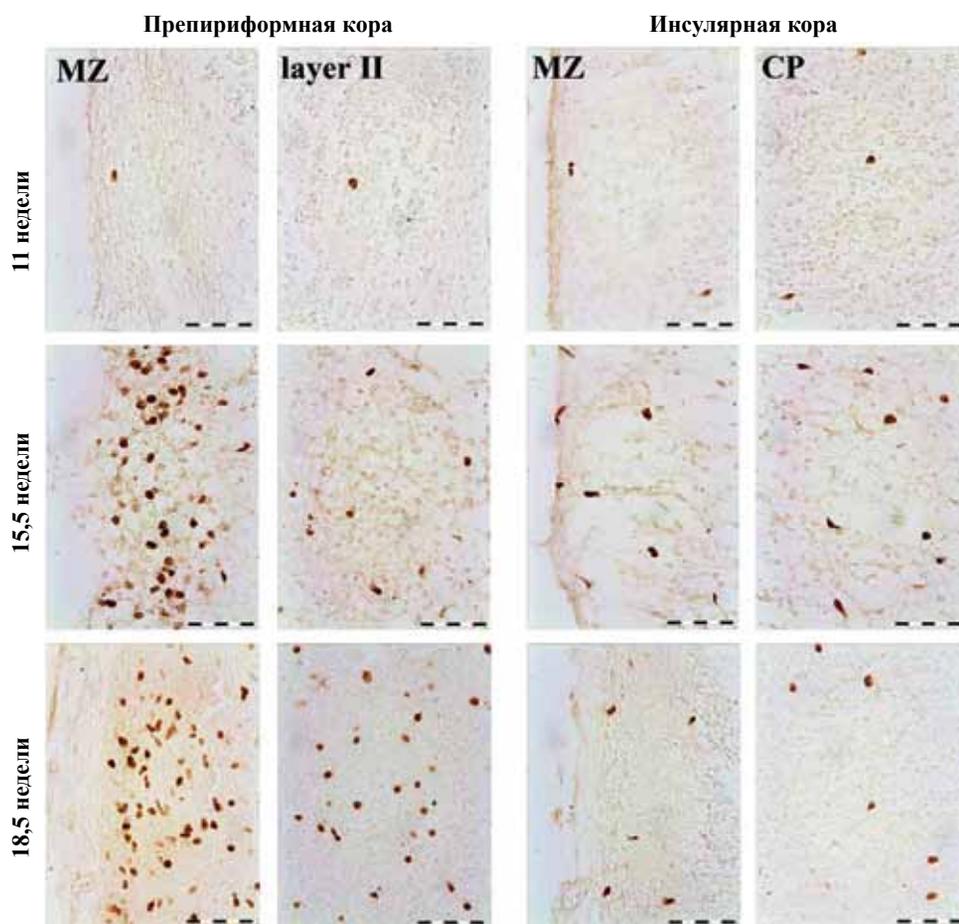


Рис. 2. Olig-2 иммунореактивность в пределах препириформной и инсулярной коры на разных сроках гестации. MZ – маргинальный (I) слой, II слой – гранулярный слой препириформной коры, CP – корковая пластинка инсулярной коры. Метка 50 мкм

Динамика изменения относительной плотности нейробластов в пределах II и III слоев препириформной коры отличается: в пределах палеокортикальной пластинки относительная плотность Olig-2 нейробластов постепенно увеличивается на 15–19-й неделях. В позднефетальном периоде на 30-й неделе и позже эти показатели в пределах собственно палеокортикальной пластинки значительно возрастают, что особенно выражено для III слоя препириформной коры: относительная плотность III слоя достоверно выше по сравнению со II слоем на 30-й неделе развития (рис. 1 Д).

Отличия в динамике изменений показателей плотности Olig-2-нейробластов и ИП и относительной плотности Olig-2-нейробластов мы связываем с тем фактом, что общая плотность клеток также падает после 18 недель развития, достигая промежуточных значений на сроках 19–27 недель, после 30 недель приближаясь к значениям, которые сохраняются до рождения. Изменение общей плотности клеток может объясняться тем, что процессы активной миграции и дифференцировки сменяются процессами роста и созревания в позднем фетальном периоде.

GFAP-иммунореактивные элементы впервые появляются в краевой зоне маргинального слоя на границах палеокортикальной области, а также на стыке зон Pp1–Pp2 на 15–16-й неделях развития. GFAP-иммунореактивность выявляется на пути миграции нейробластов по внешней дуге развивающейся ограды (презумптивная наружная капсула). Инсулярная кора на этих сроках GFAP-иммунонегативна. К 17-й неделе маргинальный слой древней препириформной коры демонстрирует GFAP-иммунопозитивные клетки и волокна, в пределах II и III слоя наблюдаются отдельные GFAP-иммунореактивные элементы. К 18-й неделе появляются единичные GFAP-иммунореактивные элементы в маргинальной зоне инсулярной коры (более многочисленны в области переходного  $ii_0$  поля, непосредственно граничащего с палеокортикальной пластинкой), корковая пла-

стинка остается GFAP-иммунонегативной. На 18–19-й неделях развития GFAP-иммунореактивные клетки астроцитарной цитоморфологии распространены также во II и III слоях развивающейся палеокортикальной пластинки. Маргинальная зона инсулярной коры содержит меньше GFAP-иммунореактивных элементов по сравнению с препириформной зоной. Эта разница сохраняется и на более поздних сроках, 26–27 недель (рис. 3). Коровая пластинка неокортекса остается GFAP-иммунонегативной на изученных сроках раннего фетального периода развития. Таким образом, GFAP-иммунореактивные волокна и клетки выявляются в пределах палеокортекса на более ранних сроках, чем в инсулярной коре, опережающее развитие палеокортикальной коры сохраняется и на более поздних сроках развития.

МВР-иммунореактивные волокна в пределах коры на нашем материале впервые удалось выявить в составе LOT не ранее 30-й недели. LOT первым подвергается миелинизации в процессе развития коры уже на

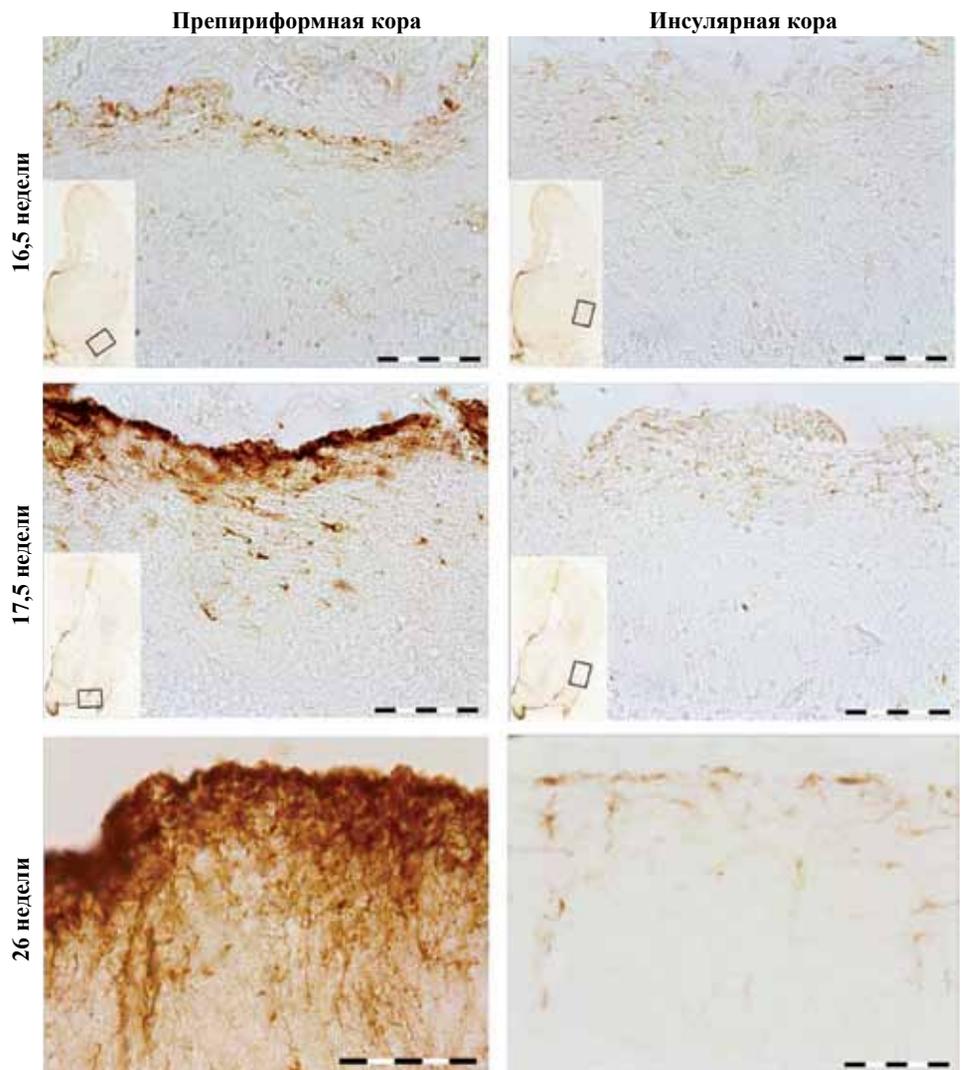


Рис. 3. GFAP-иммунореактивность в маргинальном (I) слое препириформной и инсулярной коры на разных сроках гестации. Метка 50 мкм



Рис. 4. МВР-иммунореактивность в латеральном обонятельном тракте новорожденного. Локализация МВР-иммунофлуоресцентной метки строго в пределах тела олигодендроцита указывает на его незрелый статус. Метка 10 мкм

30-й неделе развития. Кроме МВР-иммунореактивных волокон в составе LOT на 30-й неделе развития и позже у новорожденных были обнаружены МВР-иммунопозитивные клетки. Некоторые из них демонстрировали колокализацию с маркером Olig-2. Наличие МВР-иммунореактивности у новорожденных совпадает с классическими данными по развитию миелинизации мозга человека – полушария переднего мозга подвергаются миелинизации в последнюю очередь, уже после рождения, однако у новорожденных отмечается миелинизация обонятельных трактов [2]. В исследованном нами материале иммунопозитивная реакция с антителами к МВР была локализована строго в теле клетки (рис. 4), что свидетельствует о незрелом статусе олигодендроцита [7]. Согласно МВР-иммунореактивному статусу, LOT не содержал зрелых олигодендроцитов к моменту рождения.

### Заключение

На примере Olig-2 нейробластов мы показали, что в раннем плодном периоде (10–13-я недели) развитие корковых компонентов определяется прежде всего источниками миграции нейробластов (латеральный ганглиозный бугор). Популяция Olig-2 иммунореактивных клеток, описанная на 10–13-й неделях развития в пределах палеокортикального желудочка, может являться источником нейробластов Olig-2 линии для палеокортикальных формаций и требует дальнейшего изучения. В среднефетальном периоде глиальная дифференцировка препириформной коры носит опережающий характер по сравнению с переходной инсулярной зоной, что показано с использованием антител как к транскрипционному фактору Olig-2, так и к GFAP. Опережающее развитие палеокортикальной зоны сохраняется и на поздних этапах пренатального онтогенеза. Клетки и волокна LOT первыми проявляют МВР-иммунореактивность в пределах паллиума к 30-й неделе развития. При этом МВР-иммунореактивные олигодендроциты LOT демонстрируют незрелый статус у плодов неонатального возраста (38–40 недель).

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00463/17.

### Литература

1. Филимонов И.Н. Избранные труды. М.: Медицина, 1974. 339 с. [Filimonoff I.N. Selected works. M.: Meditzina, 1974. 339 p. (In Russ.)]
1. Дзугаева С.Б. Онтогенез проводящих путей мозга человека. В кн.: Развитие мозга ребенка / Под ред. С.А. Саркисова. Л.: Медицина, 1965. С. 240–256. [Dzugavaeva S.B. Conductive tracts ontogeny in the human brain. In: Child Brain Development / Ed. by S.A. Sarkisov. L.: Medicina, 1965, P. 240–248. (In Russ.)]
2. Allison A.C. The secondary olfactory areas in the human brain // J Anat. 1954;88:481–8.
3. Crosby E.C. Humphrey T. Studies of the vertebrate telencephalon. II. the nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus, tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man // J Comp Neurol. 1941;74(2):309–52.
4. Gomez-Climent M.A., Castillo-Gomez E., Varea E., Guirado R., Blasco-Ibanez J.M., Crespo C., Martinez-Guijarro F.J., Nacher J. A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood // Cereb Cortex. 2008;18:2229–40.
5. Humphrey T. The development of the olfactory and accessory olfactory formations in human embryos and fetuses // J Comp Neurol. 1940;73:P. 431–68.
6. Jakovcevski I., Zecevic N. Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon // Glia. 2005;49(4):480–91.
7. Kornack D.R., Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain // Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2001;98(8):4752–7.
8. Macci G. The ontogenic development of the olfactory telencephalon in man // J Comp Neurol. 1951;95:245–305.
9. Meyer G., Wahle P. The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex // Eur J Neurosci. 1999;11:3937–44.
10. Middeldorp J., Hol E.M. GFAP in health and disease // Prog Neurobiol. 2011;93:421–43.
11. Neville K.R., Haberly L.B. Olfactory cortex. In: G.M. Shepherd (ed.). The Synaptic Organization of the Brain. N.Y.: Oxford University Press, 2004. P. 415–54.
12. Othman A., Frim D.M., Polak P. et al. Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration // Glia. 2011;59:914–26.
13. Rakic S., Zacevic N. Early Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Human Fetal Telencephalon // Glia. 2003;41:117–27.

14. *Sarma A.A., Richard M.B., Greer C. A.* Developmental Dynamics of Piriform Cortex // *Cereb Cortex*. 2011;21:1231–45.
15. *Sarnat H.B.* Immunocytochemical markers of neuronal maturation in human diagnostic neuropathology // *Cell Tissue Res*. 2015;359:279–94.
16. *Tan B., Yu J., Yin Y., Jia G., Jiang W., Yu L.* The Olig family affects central nervous system development and disease // *Neural Regen Research*. 2014;9(3):329–36.
17. *Wegner M.* Expression of transcription factors during oligodendroglial development // *Microsc Res Tech*. 2001;52(6):746–52.

## CHARACTERISTICS OF GLIOGENESIS IN PREPIRIFORM CORTEX IN EARLY HUMAN FETUSES

*A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova*

The aim of the work was the comparative characteristic of the dynamics of gliogenesis in the paleocortex during early human fetal development. Prepiriform cortex is part of paleocortex, phylogenetically oldest pallial division associated with olfaction. However, prenatal and postnatal developing paleocortex receives a little attention from neuroscientists. We present the results of the comparative study of prepiriform cortex in human fetuses dated from 8 to 19 weeks of gestation with the use of glial markers (Olig-2, GFAP, MBP). For comparative analysis, late fetuses aged from 26 to 34 gestational weeks were examined. At early fetal stages (11-13 weeks), glial differentiation dynamics in the different pallial regions is determined by neuroblast sources and at later stages, by proper developmental timetable in the regions and correspondent maturation of association pathways. Comparative analysis of the Olig-2- and GFAP-immunoreactivity patterns evidenced of advanced glial differentiation and maturation within paleocortical region and of prior marginal (I) layer development. On 13,5-15,5 weeks of gestation, the number of Olig-2-neuroblasts increased. Period of 15-17 weeks is critical for GFAP-immunoreactive astrocyte generation in prepiriform area. We have described no MBP-immunoreactivity within cortical region at examined stages. lateral olfactory within pallium tract is primarily subjected to myelination at the 30<sup>th</sup> week of gestation.

*Key words:* paleocortex, fetal stages, prenatal ontogenesis, glial differentiation, Olig-2, GFAP, MBP

### Информация об авторах

Харламова Анастасия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва ул. Цюрупы, 3. Телефон 8 (499) 120 0050. E-mail: grossulyar@gmail.com

Годовалова Ольга Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии.

Адрес: 101000, Москва, ул. Покровка, д. 22а. Телефон 8 (495) 624 2317. E-mail: asinello@gmail.com

*Материал поступил в редакцию 27 декабря 2017 года*

# МОРФОМЕТРИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ТЕНОНОВОЙ КАПСУЛЫ ПРИ РАЗНЫХ ВИДАХ РЕФРАКЦИИ У ДЕТЕЙ

Е.Л. Куренков<sup>1</sup>, В.С. Рыкун<sup>1</sup>, С.А. Гордеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

<sup>2</sup> Филиал № 1 ФГКУ «354 Военный клинический госпиталь» Минобороны обороны России, Челябинск

Проведен морфометрический анализ ультраструктуры фибробластов теноновой капсулы. Исследованы образцы теноновой капсулы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии при различных видах клинической рефракции: при гиперметропии исследовано 25 образцов, при миопии слабой степени – один, при миопии средней степени – шесть образцов, при миопии высокой степени – 15. Установлено, что при прогрессирующей миопии площадь ядра фибробластов больше, чем при гиперметропии ( $p \leq 0,05$ ), протяженность кариолеммы достигает при прогрессирующей миопии  $6,99 \pm 0,199$  нм, при гиперметропии –  $5,40 \pm 0,27$  нм ( $p \leq 0,05$ ). При прогрессировании миопии регистрируется гиперплазия ядрышек фибробласта, количество составляет  $0,17 \pm 0,015$  на  $1 \text{ мкм}^2$  ядра, при гиперметропии –  $0,12 \pm 0,006$  на  $1 \text{ мкм}^2$  ядра ( $p \leq 0,05$ ). При прогрессировании миопии по сравнению с гиперметропией отмечаются гиперплазия и гипертрофия митохондрий (количество митохондрий  $2,05 \pm 0,14$  на  $1 \text{ мкм}^2$  клетки, толщина наружной мембраны  $7,49 \pm 0,06$ , толщина крист  $7,16 \pm 0,17$  нм, максимальный диаметр митохондрий  $124,87 \pm 7,18$  нм,  $p \leq 0,05$ ). Регистрируется гиперплазия лизосом фибробластов при прогрессирующей миопии по сравнению с гиперметропией,  $0,64 \pm 0,08$  на  $1 \text{ мкм}^2$  клетки ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, с усилением рефракции выявляется увеличение количества органоидов фибробластов – ядрышек, митохондрий, лизосом. Данные изменения свидетельствуют о внутриклеточной гиперплазии. К признакам субклеточной гипертрофии относят увеличение площади ядра, протяженности кариолеммы максимального диаметра, толщины наружной мембраны и крист митохондрий.

*Ключевые слова:* фибробласты, ультраструктурная морфометрия, гиперплазия, тенонова капсула, рефракция, прогрессирующая миопия

Аномалии рефракции характеризуются некоторыми морфологическими особенностями, которые связаны с ремоделированием фиброзной оболочки глазного яблока, в том числе теноновой капсулы. В литературе представлены изменения качественных и количественных показателей клеточного состава [1, 4, 5, 9], экстрацеллюлярного матрикса [2, 9, 10], ультраструктур фибробластов теноновой капсулы [3, 5, 6, 11].

До настоящего времени ультраструктурные особенности фибробластов теноновой капсулы глаза в морфометрическом аспекте при разных видах клинической рефракции у детей не исследованы.

Проведение ультраструктурной морфометрии фибробластов является критерием количественной оценки адаптивных процессов, протекающих при аметропиях.

Целью нашей работы было проведение морфометрического анализа ультраструктур фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции у детей.

## Материалы и методы

Исследованы особенности теноновой капсулы 47 образцов у 35 детей при различных видах клинической рефракции: при гиперметропии исследовано 25 образцов, при прогрессирующей миопии слабой степени – один, средней степени – шесть, высокой степени – 15 образцов.

Фрагменты теноновой капсулы получены в ходе биопсийного забора при проведении оперативного лечения косоглазия при гиперметропии и операций типа ретросклеропломбажа при прогрессирующей миопии. На проведение исследования получено разрешение этического комитета (протокол № 2 от 25.09.2013).

Все образцы теноновой капсулы изучены методом трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Материал подвергали первичной фиксации в фиксаторе Карновского. Затем биоптаты теноновой капсулы подготавливали для исследования в трансмиссионном электронном микро-

скопе, проводили фиксацию, дегидратацию, пропитку заливочными средами – эпоксидными смолами [8].

Полученные электронные микрофотографии обрабатывали и анализировали при помощи программы ImageJ, вычисляли площади и другие статистические показатели разных выделенных областей интереса на изображениях.

Количество ультраструктур каждого образа теновой капсулы подсчитывали и оценивали на единицу площади полутонкого среза в  $1 \text{ мкм}^2$ , а затем рассчитывали и выражали на единицу площади –  $1 \text{ мкм}^2$  клетки ( $1 \text{ мкм}^2$  ядра фибробласта при подсчете ядрышек), протяженность кариолеммы выражали в микрометрах, максимальный диаметр, толщину наружной мембраны и крист митохондрий – в нанометрах.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ SPSS 15.0 и MS Excel 2010. Проведен дескриптивный анализ с расчетом  $M \pm m$  – среднего и стандартной ошибки среднего, 95% доверительного интервала, оценка различий проводилась при помощи критерия Манна–Уитни, взаимосвязи между параметрами изучали при помощи корреляционного анализа, расчета коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) и его значимости.

## Результаты и обсуждение

В структуре фибробластов теновой капсулы при разных видах аномалий рефракции регистрируются изменения количественного состава ультраструктур.

Морфометрический анализ площади ядра и протяженности кариолеммы фибробласта при разных видах клинической рефракции представлен в таблицах 1 и 2.

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия площади ядра фибробластов

теновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и площадью ядра фибробластов составил  $r_s=0,682$  при  $p=0,0001$ . Это свидетельствует о высокой синтетической активности фибробласта, связанной с репликацией генетического материала и синтезом мРНК в процессе транскрипции.

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия протяженности кариолеммы фибробластов теновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени ( $p=0,05$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и протяженностью кариолеммы фибробластов составил  $r_s=0,622$  при  $p=0,0001$ . Данные изменения связаны с усилением транспорта в ядро из цитоплазмы ферментов, рибосомальных белков, нуклеотидов, регулирующих синтез РНК.

Морфологические особенности ядра и кариолеммы фибробласта при аномалиях рефракции представлены на рисунках 1–4.

Изменение количества ядрышек фибробластов теновой капсулы представлено в таблице 3.

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия количества ядрышек фибробластов теновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,018$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени ( $p=0,039$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,016$ ).

Таблица 1

Площадь ядра фибробластов теновой капсулы при разных видах клинической рефракции

Показатель (мкм <sup>2</sup> )	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	0,93±0,73	1,60±0,82*	1,23±0,12	1,73±0,081***
95% доверительный интервал	[0,78; 1,08]	[1,43; 1,77]	[0,92; 1,54]	[1,56; 1,91]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

Таблица 2

Протяженность кариолеммы фибробластов теновой капсулы при разных видах клинической рефракции

Показатель (мкм)	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	5,40±0,27	6,99±0,199*	6,37±0,35**	7,24±0,23***
95% доверительный интервал	[4,84; 5,97]	[6,57; 7,40]	[5,46; 7,28]	[6,73; 7,74]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

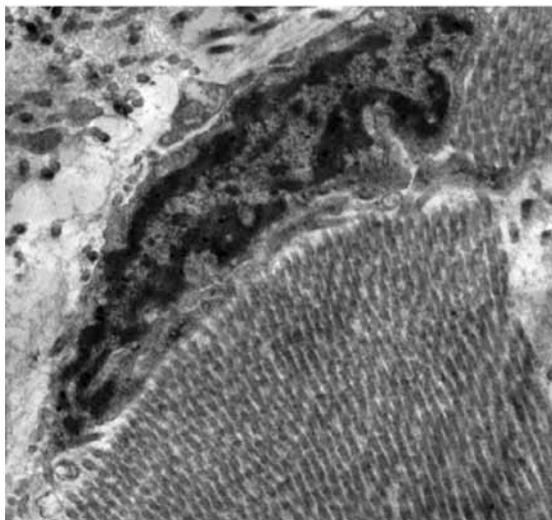


Рис. 1. Фибробласт с атрофичным ядром веретеновидной формы при гиперметропии. Трансмиссионная электронная микроскопия, ×4000

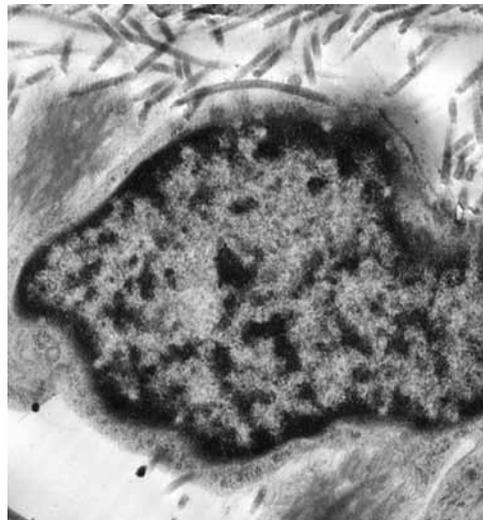


Рис. 2. Фибробласт с гипертрофированным ядром при прогрессирующей миопии. Трансмиссионная электронная микроскопия, ×4000

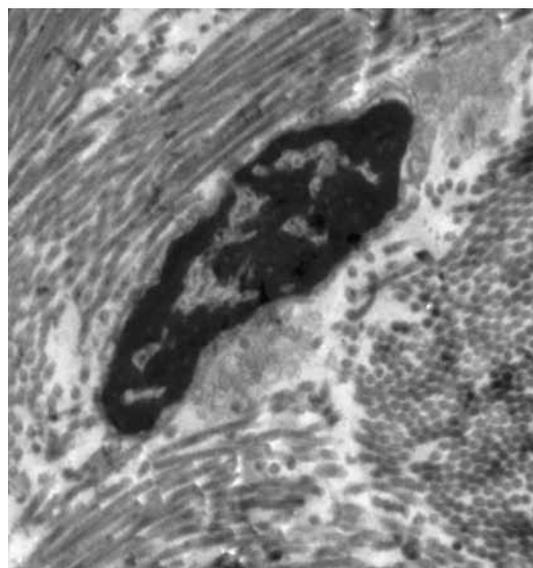


Рис. 3. Кариолема фибробластов не образует инвагинаций при гиперметропии. Трансмиссионная электронная микроскопия, ×4000

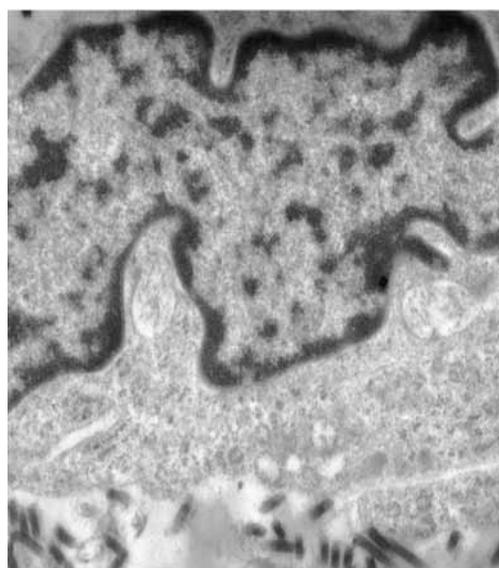


Рис. 4. Инвагинации кариолеммы фибробласта при прогрессирующей миопии. Трансмиссионная электронная микроскопия, × 4000

Таблица 3

**Количество ядрышек фибробластов теновой капсулы при разных видах клинической рефракции**

Показатель (на 1 мкм <sup>2</sup> ядра)	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	0,12±0,006	0,17±0,015*	0,16±0,018**	0,18±0,02***
95% доверительный интервал	[0,1; 0,13]	[0,14; 0,20]	[0,11; 0,21]	[0,14; 0,23]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени, p<0,05

Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и количеством ядрышек фибробластов составил  $r_s=0,402$  при  $p=0,006$ , что свидетельствует об усилении активности районов ядрышковых организаторов и интенсификации рибосомального синтеза в клетке.

Морфометрия митохондрий фибробластов теноновой капсулы представлена в таблицах 4–7.

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия количества митохондрий фибробластов теноновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и количеством митохондрий фибробластов составил  $r_s=0,794$  при  $p=0,0001$ .

Таблица 4

**Количество митохондрий фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции**

Показатель (на 1 $\mu\text{м}^2$ )	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	0,79±0,11	2,05±0,14*	1,31±0,20	2,38±0,09***
95% доверительный интервал	[0,55; 1,03]	[1,76; 2,33]	[0,76; 1,83]	[2,17; 2,59]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

Таблица 5

**Толщина наружной мембраны митохондрий фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции**

Показатель (нм)	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	7,05±0,33	7,49±0,06*	7,22±0,09	7,63±0,032***
95% доверительный интервал	[6,98; 7,12]	[7,37; 7,60]	[6,97; 7,47]	[7,56; 7,70]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

Таблица 6

**Толщина крист митохондрий фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции**

Показатель (нм)	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	7,16±0,12	7,16±0,17*	7,17±0,06**	7,16 0,006***
95% доверительный интервал	[6,92; 7,41]	[7,12; 7,20]	[7,00; 7,33]	[7,14; 7,17]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

Таблица 7

**Диаметр митохондрий фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции**

Показатель (нм)	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	81,37±3,15	124,87±7,18*	90,23±3,83**	142,47±6,72***
95% доверительный интервал	[74,86; 87,88]	[109,89; 139,85]	[80,39; 100,07]	[127,97; 156,97]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия толщины наружной мембраны митохондрий фибробластов теноновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и толщиной наружной мембраны митохондрий фибробластов составил  $r_s=0,767$  при  $p=0,0001$ .

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия толщины крист митохондрий фибробластов теноновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени ( $p=0,022$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и толщиной крист митохондрий фибробластов составил  $r_s=0,618$  при  $p=0,0001$ .

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия максимального диаметра митохондрий фибробластов теноновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени ( $p=0,04$ ), между

гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и максимальным диаметром митохондрий фибробластов составил  $r_s=0,780$  при  $p=0,0001$ .

Данные изменения митохондрий предполагают усиление процессов окислительного фосфорилирования, связанного с высокими потребностями в макроэргических соединениях – АТФ, АДФ.

Изменение количества лизосом фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции представлено в таблице 8.

Критерий Манна–Уитни демонстрирует статистически достоверные различия количества лизосом фибробластов теноновой капсулы между гиперметропией и прогрессирующей миопией ( $p=0,0001$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени ( $p=0,014$ ), между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени ( $p=0,0001$ ). Коэффициент корреляции Спирмена между рефракцией и количеством лизосом фибробластов составил  $r_s=0,796$  при  $p=0,0001$ , что свидетельствует об усилении процессов внутриклеточного гидролиза.

Морфологические изменения лизосом при аметропиях представлены на рисунках 5 и 6.

Таблица 8

Количество лизосом фибробластов теноновой капсулы при разных видах клинической рефракции

Показатель (на 1 $\mu\text{м}^2$ )	Гиперметропия	Прогрессирующая миопия	Миопия средней степени	Миопия высокой степени
Среднее и стандартная ошибка среднего	0,17±0,03	0,64±0,08*	0,30±0,06**	0,82±0,08***
95% доверительный интервал	[0,11; 0,23]	[0,47; 0,80]	[0,15; 0,45]	[0,64; 0,99]

\* – различия между гиперметропией и прогрессирующей миопией; \*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией средней степени; \*\*\* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией высокой степени,  $p<0,05$

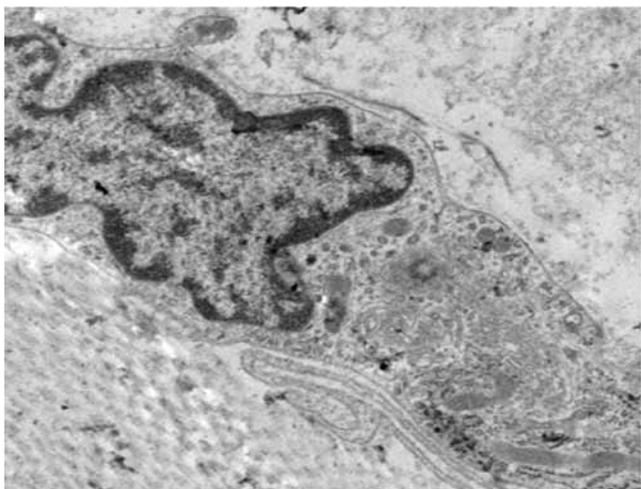


Рис. 5. Единичные лизосомы фибробласта при гиперметропии.

Трансмиссионная электронная микроскопия,  $\times 4000$

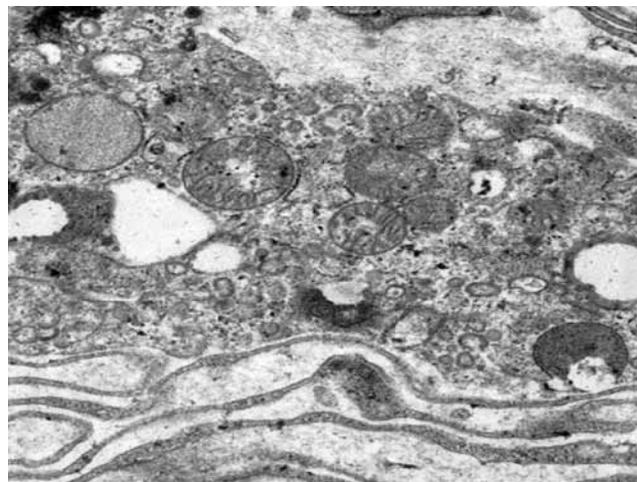


Рис. 6. Многочисленные лизосомы фибробласта при прогрессирующей миопии.

Трансмиссионная электронная микроскопия,  $\times 8000$

Внутриклеточная гиперплазия ультраструктур фибробластов является маркером высокой функциональной активности клетки и отражает второй принцип материального обеспечения гомеостаза биологических систем [7].

### Заключение

С усилением рефракции регистрируется увеличение количества органоидов фибробластов – ядрышек, митохондрий, лизосом. Данные изменения свидетельствуют о внутриклеточной гиперплазии. К признакам субклеточной гипертрофии относят увеличение площади ядра, протяженности кариолеммы, максимального диаметра, толщины наружной мембраны и крист митохондрий.

В основе адаптационных процессов теноновой капсулы глазного яблока при аномалиях рефракции у детей лежат гиперплазия и гипертрофия ультраструктур фибробластов.

### Литература

1. Аветисов Э.С., Андреева Л.Д., Хорошилова-Маслова И.П. Электронно-микроскопическое изучение склеры глаза человека в разных возрастных группах // Вестник офтальмологии. 1979. № 1. С. 24–30. [Avetisov E.S., Andreeva L.D., Khoroshilova-Maslova I.P. Electron-microscopic examination of the sclera of the human eye in different age groups // Vestnik oftalmologii. 1979. V. 1. P. 24–30. (In Russ.)].
2. Иомдина Е.Н., Тарутта Е.П., Игнатьева Т.Ю., Шехтер А.Б. и др. Структурно-морфологические особенности коллагена теноновой капсулы глаза при гиперметропии и миопии // Российский общенациональный офтальмологический форум: Сборник научных трудов. 2009. Т. 1. С. 370–374. [Iomdina E.N., Tarutta E.P., Ignatyeva T.Y. Shekhter A.B. et al. Structural and morphological features of the collagen of the tenon capsule of the eye in hypermetropia and myopia // Russian National Ophthalmologic Forum. Collection of scientific papers. 2009. V. 1. P. 370–374. (In Russ.)].
3. Иомдина Е.Н. Фундаментальные исследования биохимических и ультраструктурных механизмов патогенеза прогрессирующей миопии // Российский офтальмологический журнал. 2008. № 3. С. 7–12. [Iomdina E.N. Fundamental research of biochemical and ultrastructural mechanisms of the pathogenesis of progressive myopia // Russian Ophthalmological Journal. 2008. V. 3. P. 7–12. (In Russ.)].
4. Куренков Е.Л., Рыкун В.С., Мохначева С.А., Зубарев И.В., Болотов А.А. Морфометрические особенности теноновой капсулы при различных видах клинической рефракции // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10, № 2. С. 15–18. [Kurenkov E.L., Rykun V.S., Mokhnacheva S.A., Zubarev I.V., Bolotov A.A. Morphometric features of the tenon capsule for various types of clinical refraction // Medical bulletin Bashkortostan. 2015. V. 10, No 2. P. 15–18. (In Russ.)].
5. Куренков Е.Л., Рыкун В.С., Гордеева С.А. Особенности клеточного состава теноновой капсулы при различных видах клинической рефракции у детей // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2016. Т. 4. № 56. С. 70–73. [Kurenkov E.L., Rykun V.S., Gordeeva S.A. Features of the cellular composition of the tenon capsule for various types of clinical refraction in children // Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2016. V. 4, No 56. P. 70–73. (In Russ.)].
6. Куренков Е.Л., Рыкун В.С., Мохначева С.А., Зубарев И.В. Электронно-микроскопическая характеристика теноновой капсулы при прогрессировании миопии // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10, № 2. С. 12–15. [Kurenkov E.L., Rykun V.S., Mokhnacheva S.A., Zubarev I.V. Electron microscopic characteristics of the tenon capsule in the progression of myopia // Medical bulletin of Bashkortostan. 2015. V. 10, No 2. P. 12–15. (In Russ.)].
7. Саркисов Д.С. Структурные основы надежности биологических систем // Архив патологии. 1994. Т. 56, № 5. С. 4–8. [Sarkisov D.S. Structural basis of the reliability of biological systems // Archive of pathology. 1994. V. 56, No 5. P. 4–8. (In Russ.)].
8. Kuo J. (ed.). Electron microscopy: methods and protocols. 2nd ed. Humana Press, 2007. 625 p.
10. McBrien N., Jobling A., Gentle A. Biomechanics of the sclera in myopia: extracellular and cellular factors // Optom Vis Sci. 2009;86(1):23–30.
11. Shouly Y., Miller B., Lichrig C., Modan M. et al. Tenon's capsule: ultrastructure of collagen fibrils in normals and infantile esotropia // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992;33(3):651–6.
12. Ulyanova N.A., Dumbrova N.E., Molchanyuk N.I. Morphological changes of sclera in rats with experimental myopia // Morphologia. 2014;8(2):72–6.

## MORPHOMETRY OF FIBROBLASTS OF THE TENON CAPSULE AT DIFFERENT TYPES OF REFRACTION IN CHILDREN

*E.L. Kurenkov, V.S. Rykun, S.A. Gordeeva*

Were carried out morphometric analysis of the fibroblasts ultrastructure of tenon capsule. Were examined samples of the tenon capsule with the help of transmission electron microscopy with various types of clinical refraction: 25 samples were examined with hyperopia, with low degree myopia – 1, medium degree myopia – 6 specimens and high degree myopia – 15. It was found that with progressive myopia, the area of the nucleus fibroblasts is larger than with hypermetropia ( $p \leq 0.05$ ), the extent of the karyoemma reaches with progressive myopia  $6.99 \pm 0.199$  nm, with hypermetropia –  $5.40 \pm 0.27$  nm, ( $p \leq 0.05$ ). With the progression of myopia, hyperplasia of the fibroblast nucleoli is registered, the amount is  $0.17 \pm 0.015$  for  $1 \mu\text{m}^2$  of the nucleus, for hypermetropia –  $0.12 \pm 0.006$  for  $1 \mu\text{m}^2$  of the nucleus, ( $p \leq 0.05$ ). With myopia

progression, compared with hypermetropia, hyperplasia and hypertrophy of mitochondria (mitochondrial count  $2.05 \pm 0.14$  per  $1 \text{ m}^2$  cells, outer membrane thickness  $7.49 \pm 0.06$ , thickness of crista  $7.16 \pm 0.17$  nm, maximum diameter of mitochondria  $124.87 \pm 7, 18$  nm,  $p \leq 0.05$ ). Lysosome hyperplasia of fibroblasts with progressive myopia,  $0.64 \pm 0.08$  per  $1 \text{ m}^2$  of cells, ( $p \leq 0.05$ ) is recorded as compared with hypermetropia. Thus, with increasing refraction, an increase in the number of fibroblast organoids is observed: nucleolus, mitochondria, lysosomes, which indicates intracellular hyperplasia, as well as the core area, the length of the maximal diameter of the karyolemma, the thickness of the outer membrane and the mitochondrial cristas, which are signs of hypertrophy.

*Key words:* fibroblasts, ultrastructural morphometry, hyperplasia, tenon capsule, refraction, progressive myopia

### **Информация об авторах**

Куренков Евгений Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии и оперативной хирургии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454076, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Рыкун Вадим Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454076, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Гордеева (Мохначева) Светлана Александровна – врач-офтальмолог, филиала № 1 ФГКУ «354 ВКГ» Минобороны России.

Адрес: 454008, Челябинск, Свердловский проспект, д. 28а. Телефон 8 951 815 5634. E-mail: mohnacheva87@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 4 декабря 2017 года*

# ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕНОТИПА РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ И ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ ГЕНОВ

*А.В. Лохонина<sup>1,4</sup>, А.С. Покусаев<sup>2</sup>, И.В. Арутюнян<sup>1,2</sup>, А.В. Ельчанинов<sup>1,4</sup>,  
А.В. Макаров<sup>1,3</sup>, И.З. Еремина<sup>4</sup>, В.В. Суровцев<sup>4</sup>, Г.Б. Большакова<sup>2</sup>,  
Д.В. Гольдштейн<sup>5</sup>, Т.Х. Фатхудинов<sup>1,2,4</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

<sup>5</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

Изучены профиль экспрессируемых генов цитокинов и маркеров макрофагов, фенотип и фагоцитарная активность резидентных макрофагов печени. Обнаружено, что большая часть резидентных макрофагов печени имела фенотип F4/80<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>. Воздействие факторов, поляризующих макрофаги в направлении M2-фенотипа, приводило к повышению экспрессии CD86 и появлению экспрессии Ki67. После активации M1 и M2 индукторами у резидентных макрофагов печени повышалась экспрессия в основном противовоспалительных цитокинов. Резидентные макрофаги печени обладали выраженной фагоцитарной активностью, которая снижалась к 5 часам, однако добавление индукторов как M1, так и M2 фенотипа стимулировало фагоцитоз до 24 часов после внесения латексных частиц.

*Ключевые слова:* макрофаги, печень, цитокины, фагоцитоз

Резидентные макрофаги печени (клетки Купфера) являются одним из ключевых клеточных типов, регулирующих репаративную регенерацию печени [10, 12]. Существует несколько представлений об источниках развития резидентных макрофагов печени. В соответствии с одним из них популяция макрофагов печени постоянно пополняется за счет дифференцирующихся гемопоэтических клеток красного костного мозга, в соответствии с другим резидентные макрофаги печени – самоподдерживающаяся клеточная популяция, ведущая свое происхождение из гемопоэтических клеток желточного мешка [4, 6]. Причины того, что в печени сохранились потомки первых гемопоэтических клеток, не вполне ясны. Источник происхождения органных макрофагов, вероятно, отражается на их свойствах, а также на закономерностях течения физиологических и патологических процессов в печени, что мало изучено.

Целью нашей работы стало изучение фенотипа, профиля экспрессии генов цитокинов резидентных макрофагов печени.

## Материалы и методы

### *Выделение резидентных макрофагов из печени крысы*

Работа выполнена на самцах крыс аутбредного стока Вистар массой тела 250–300 граммов. Животным

под эфирным наркозом проводили перфузию печени раствором фосфатно-солевого буфера (40–50 мл) через воротную вену. Затем орган извлекали и взвешивали, дважды отмывали раствором Хенкса, удаляли оболочки и крупные сосуды, измельчали и инкубировали в 0,05% растворе коллагеназы типов 4 и 1 (ПанЭко, Россия) 20 минут при температуре 37°C на горизонтальном шейкере. Затем суспензию фильтровали через 100 мкм нейлоновый фильтр (SPL LifeScience, Республика Корея) и дважды отмывали от раствора ферментов (300 г, 10 минут, 20°C). После этого клетки ресуспендировали в 30 мл фосфатно-солевого буфера и центрифугировали 3 минуты при ускорении 50 g. Собирали надосадок и далее методом градиентного центрифугирования (400 g, 30 минут, 20°C) на препарате фиколл (ПанЭко, Россия) получали фракцию клеток, преимущественно состоящую из клеток Купфера. Количество и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США), после чего их подвергали иммуномагнитному сортированию на мануальном сепараторе MidiMACS™ Separator с помощью колонок LS Columns (MiltenyiBiotec, Германия) с использованием магнитных микрочастиц Anti-F4/80 MicroBeadsUltraPure (MiltenyiBiotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

### Культивирование клеток

Клетки Купфера культивировали в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). На 2-е сутки из культуры убирали неприкрепившиеся к пластику клетки. Далее частичную замену культуральной среды производили на 4-е и 7-е сутки.

### Активация по M1 фенотипу

Клетки Купфера культивировали в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 50 нг/мл GM-CSF (Cloud-CloneCorp, КНР). На 2-е сутки из культуры убирали неприкрепившиеся к пластику клетки. На 4-е сутки проводили частичную замену среды. На 7-е сутки также проводили частичную замену среды с добавлением 10 нг/мл LPS (Sigma, США) и 40 нг/мл IFN- $\gamma$  (Cloud-CloneCorp, КНР).

### Активация по M2 фенотипу

Клетки Купфера культивировали в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 100 нг/мл M-CSF (Cloud-CloneCorp, КНР). На 2-е сутки из культуры убирали неприкрепившиеся к пластику клетки. На 4-е сутки проводили частичную замену среды. На 7-е сутки также проводили частичную замену среды с добавлением 20 нг/мл IL4, 20 нг/мл IL10 и 20 нг/мл IL13 (Cloud-CloneCorp, КНР).

### Оценка фенотипа макрофагов

Фенотип резидентных макрофагов печени определяли методами иммуноцитохимии и проточной цитофлуориметрии.

### Иммуноцитохимическое исследование

Состояние популяции макрофагов изучали с помощью набора первых антител: Ki67 (1:100), CD68 (1:100), iNOs – индуцируемая NO-синтетаза (1:100), Arg1 – аргиназа 1 (1:100) производства Abcam (Великобритания) и CD206 (1:100, Santa Cruz, США), для визуализации использовали вторые антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC (1:200, Abcam, Великобритания).

### Проточная цитофлуориметрия

Для определения экспрессии специфических преимущественно для макрофагов поверхностных и внутриклеточных маркеров использовали метод проточной цитофлуориметрии. Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере в концентрации 100 тыс. клеток в 100 мкл и добавляли антитела. Для выявления внутриклеточных маркеров макрофагов предварительно проводили пермеабиллизацию с помощью набора

InsideStainKit (Lot 130-090-477, MiltenyiBiotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ осуществляли на цитофлуориметре Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter, США) с помощью программы СХР (BeckmanCoulter, США). Использовали следующие антитела: CD68-PEVio770 (MiltenyiBiotec, Германия), CD86-VioBright FITC (MiltenyiBiotec, Германия), CD11b-PE (MiltenyiBiotec, Германия), CD163-PE (Thermo Fisher, США), CD45-PerCPVio700 (MiltenyiBiotec, Германия), F4/80-PE (MiltenyiBiotec, Германия).

### Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Исследуемые макрофаги (нативные и активированные) помещали в РНК-лейтер (QIAGEN), инкубировали в течение суток при +4°C, хранили при –80°C. Из полученных образцов выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Синтез кДНК с матрицы полученной тотальной РНК осуществляли с использованием готового набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР с помощью готовых наборов реактивов qPCRmix-NS SYBR, содержащих флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I (Евроген, Россия). Праймеры для ПЦР подбирали с помощью онлайн программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Выбранные праймеры (табл.) синтезированы фирмой Евроген (Россия). Для анализа экспрессии генов цитокинов и маркеров макрофагов, таких как ген аргиназы 1 – *arg1* и ген индуцируемой NO-синтетазы – *iNOs*, использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M.V. Pfaffl [14] с учетом рекомендаций J. Vandesompele [16]. В качестве эндогенного контроля был выбран ген домашнего хозяйства *gapdh*.

### Изучение фагоцитарной активности макрофагов

Для изучения фагоцитарной активности клетки сажали на чашки Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм и коэффициентом оптического преломления 1,52 (Ibidi, Германия). Далее макрофаги активировали (7 суток преддифференцировка, 1 сутки активация), затем в среду добавляли латексные бусины 1,5 мкм (Диа-М), 5 мкл 10% суспензии на 1 мл среды. С помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL (Германия) и программного обеспечения AxioVs40 4.8.2.0 вели прижизненную съемку клеток (фазово-контрастная микроскопия,  $\times 400$ ) через 1, 2, 5 и 24 часа после добавления латексных бусин. С помощью программы Adobe Photoshop CS6 подсчитывали количество бусин на 1 клетку.

### Статистический анализ

Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США).

Таблица **Результаты**

**Список использованных праймеров**

<i>il1b</i>	CTG TCT GAC CCA TGT GAG CT
	ACT CCA CTT TGG TCT TGA CTT
<i>il4</i>	ATG TAA CGA CAG CCC TCT GA
	AGC ACG GAG GTA CAT CAC G
<i>il6</i>	TAC ATA TGT TCT CAG GGA GAT
	GGT AGA AAC GGA ACT CCA G
<i>il10</i>	GCC CAG AAA TCA AGG AGC AT
	TGA GTG TCA CGT AGG CTT CTA
<i>il12a</i>	CTG CCA AGT GTC TTA ACC AGT
	GCA GGC CTC CAG TGT GCT
<i>il13</i>	CCA GAA GAC TTC CCT GTG CA
	CCC TCA GTG GCC ATA GCG
<i>il18</i>	GAC AAA AGA AAC CCG CCT G
	ACA TCC TTC CAT CCT TCA CAG
<i>tnfa</i>	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA
	GCT ACG GGC TTG TCA CTC G
<i>iNOs</i>	CGC TGG TTT GAA ACT TCT CAG
	GGC AAG CCA TGT CTG TGA C
<i>arg1</i>	GGA TGA GCA TGA GCT CCA AG
	GCC AGC TGT TCA TTG GCT T
<i>gapdh</i>	GCGAGATCCCGCTAACATCA
	CCCTTCCACGATGCCAAAGT

**Экспрессия генов**

При анализе профиля экспрессии изучаемых генов установлено, что клетки Купфера способны отвечать на воздействие активирующих индукторов. При этом вне зависимости от индуцирующих факторов в активированных макрофагах по сравнению с нативными макрофагами повышается экспрессия как про-, так и противовоспалительных цитокинов (рис. 1). Стоит отметить, что экспрессия провоспалительных цитокинов *il1b*, *il12a* и *tnfa* активизировалась позже, чем противовоспалительных, – только через 3 суток после индуцирующего воздействия (рис. 1 А, Б, П, Р). Экспрессия гена провоспалительного цитокина *il18* отмечалась в макрофагах под влиянием факторов, стимулирующих изменение фенотипа в М1 и М2 направлении, также через 3 суток (рис. 1 Н, О). При этом в макрофагах печени отмечалась выраженная экспрессия генов противовоспалительных цитокинов *il4*, *il10*, *il13*, которая достоверно повышалась уже через 1 сутки после влияния поляризирующей среды (рис. 1 В, Г, Ж, З, Л, М).

**Изучение фенотипа резидентных макрофагов печени**

Полученные культуры неактивированных макрофагов печени по своему составу содержали примерно одинаковое количество F4/80<sup>+</sup> и CD68<sup>+</sup> клеток, около 90%, что свидетельствует о высокой чистоте выделенных культур (рис. 2 А–Д). При этом в печени практически отсутствовали CD11b<sup>+</sup> макрофаги (рис. 2 Г).

Нативная культура клеток Купфера содержала 92% F4/80<sup>+</sup>, 95% CD68<sup>+</sup> клеток, 73% CD163<sup>+</sup> клеток и 30% CD86<sup>+</sup> клеток. Таким образом, фенотип неактивированных клеток Купфера отличался выраженной экспрессией CD86 (рис. 2 В).

Активация макрофагов приводила к изменению фенотипа и клеток Купфера (рис. 3 А–Е). В клетках Купфера под действием М1 индуцирующих факторов

Сравнение двух выборочных долей проводили с помощью z-критерия. При сравнении более чем двух групп использовали One Way ANOVA или ANOVA on Ranks. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

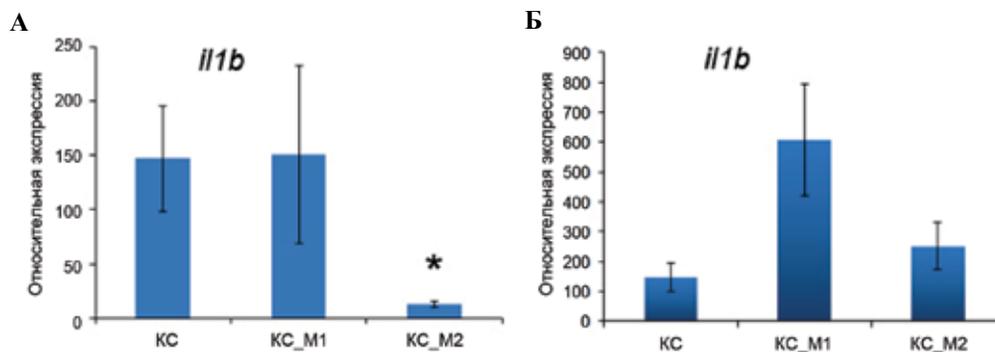


Рис. 1. Профиль экспрессируемых генов клеток Купфера: в нативных, индуцируемых в направлении М1 и М2 фенотипа через 1 сутки (А, В, Д, Ж, И, Л, Н, П, С) и 3 суток (Б, Г, Е, З, К, М, О, Р, Т) после индукции.

КС – неиндуцированные резидентные макрофаги печени, КС\_М1 – после воздействия М1 индуцирующих факторов, КС\_М2 – после воздействия М2 индуцирующих факторов

\* – статистически значимые различия по сравнению с неиндуцированными клетками Купфера, p<0,05

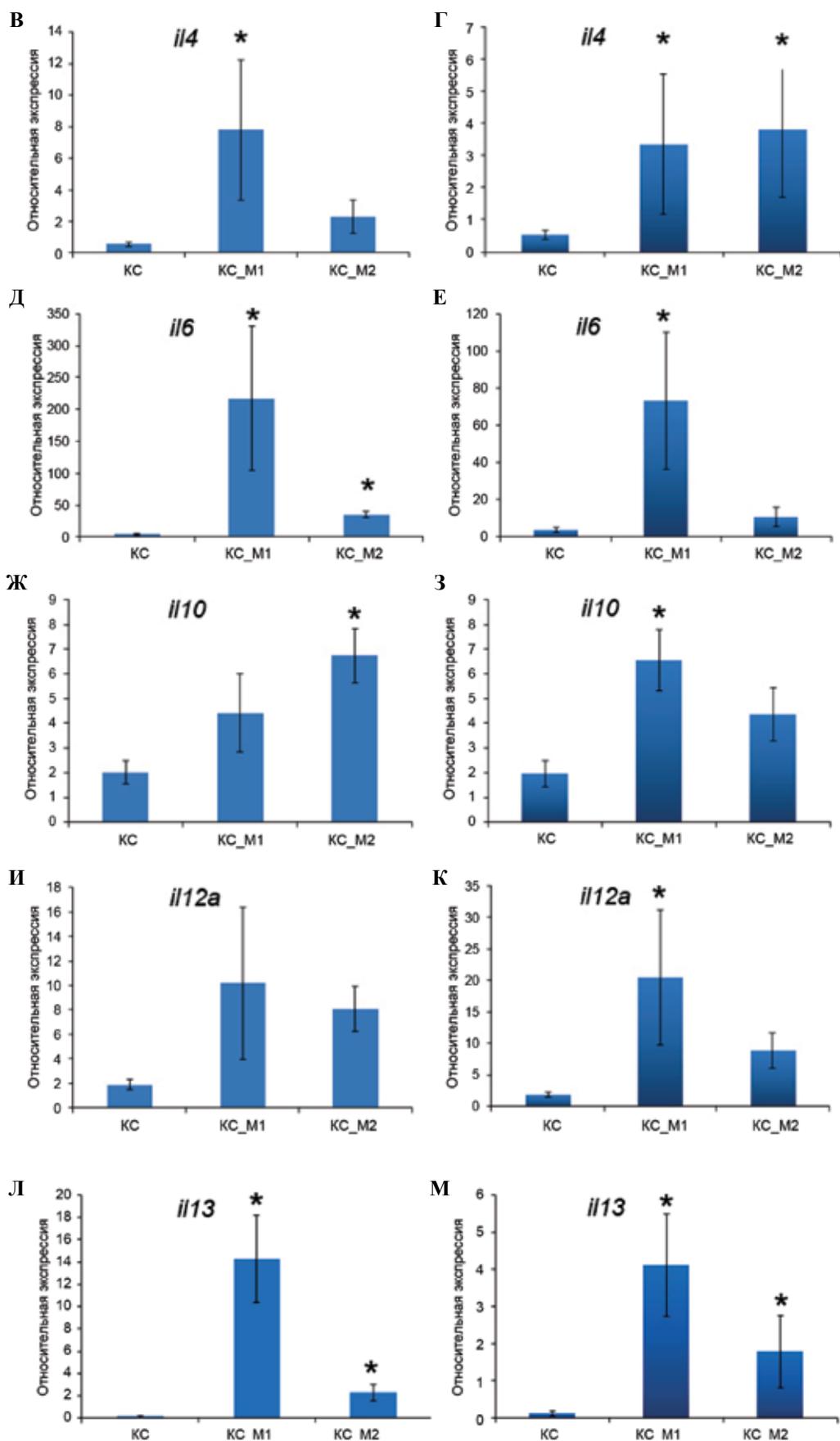


Рис. 1. Продолжение

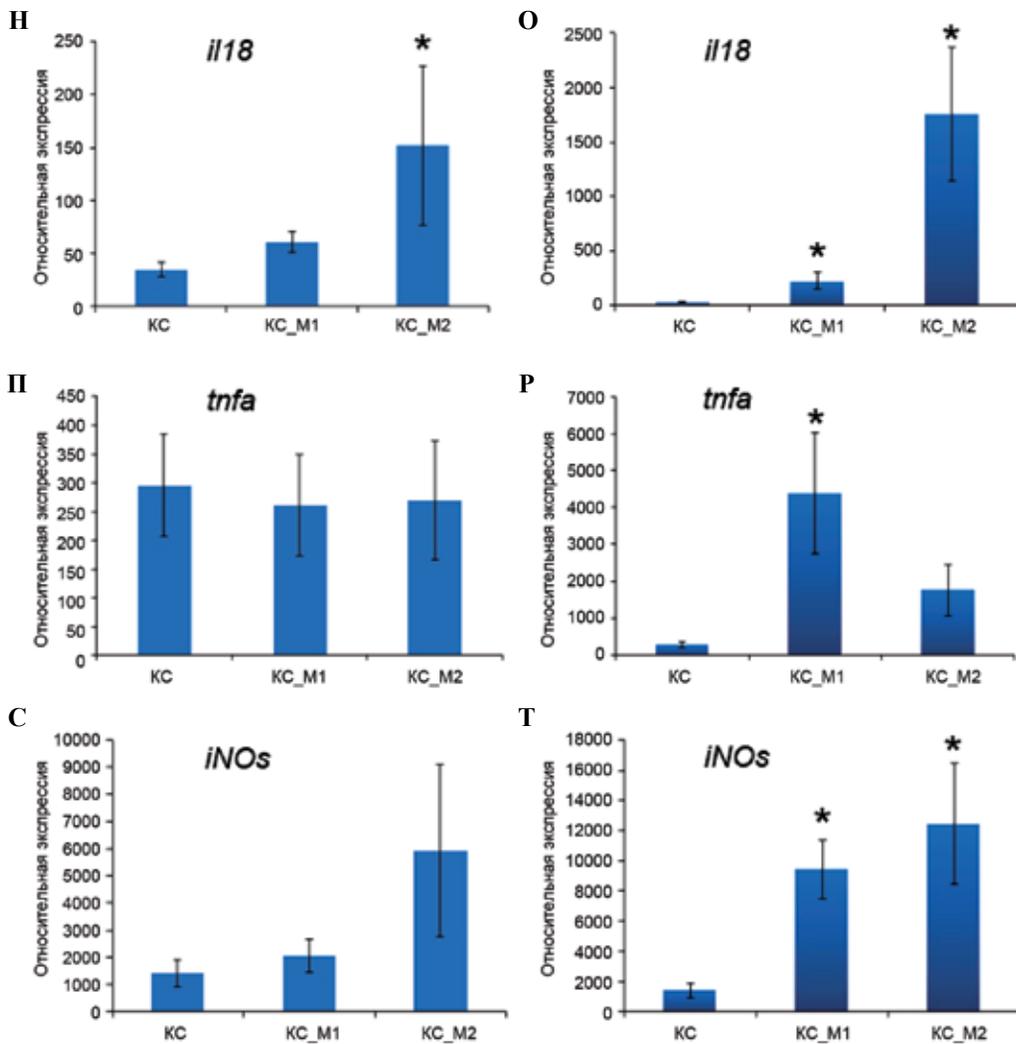


Рис. 1. Окончание

происходило снижение экспрессии маркера M2 макрофагов CD163, выраженность экспрессии CD86 практически не изменялась (рис. 3 А, В). Воздействие факторов поляризации M2 макрофагов практически не влияло на экспрессию CD163, примерно 79% клеток несло на своей поверхности данный маркер, однако приводило к значительному повышению количества CD86<sup>+</sup> клеток – до 73% (рис. 3 Г, Е). Стоит отметить, что только под влиянием M2 индуцирующих факторов в макрофагах определяется экспрессия Ki67 (рис. 4).

При изучении фенотипа макрофагов печени методом иммуноцитохимии было обнаружено, что при воздействии факторов M1 фенотипа макрофаги печени становились отростчатыми, неравномерно экспрессировали iNOs, не экспрессировали Arg1 (аргиназа 1) (рис. 5). Влияние факторов, индуцирующих M2 фенотип, приводило к тому, что макрофаги становились округлыми, экспрессировали Arg 1 (неравномерно) и не экспрессировали iNOs (рис. 5).

*Фагоцитарная активность*

При изучении фагоцитарной активности резидентных макрофагов печени выявлено, что фагоцитарная активность неактивированных макрофагов резко снижается примерно через 5 часов после добавления латексных частиц. Добавление как M1, так и M2 индукторов стимулирует фагоцитарную активность макрофагов, которые продолжают поглощать латексные частицы до 24 часов после внесения частиц в культуру (рис. 6, 7).

**Обсуждение**

Макрофагам отводится значимая роль в регуляции репаративных процессов, а также развитии патологических состояний печени [10]. При этом редко отмечается особенность резидентных макрофагов печени – их эмбриональное происхождение [6, 12]. Вероятно, источник происхождения макрофагов печени определяет особенности функционирования данных клеток

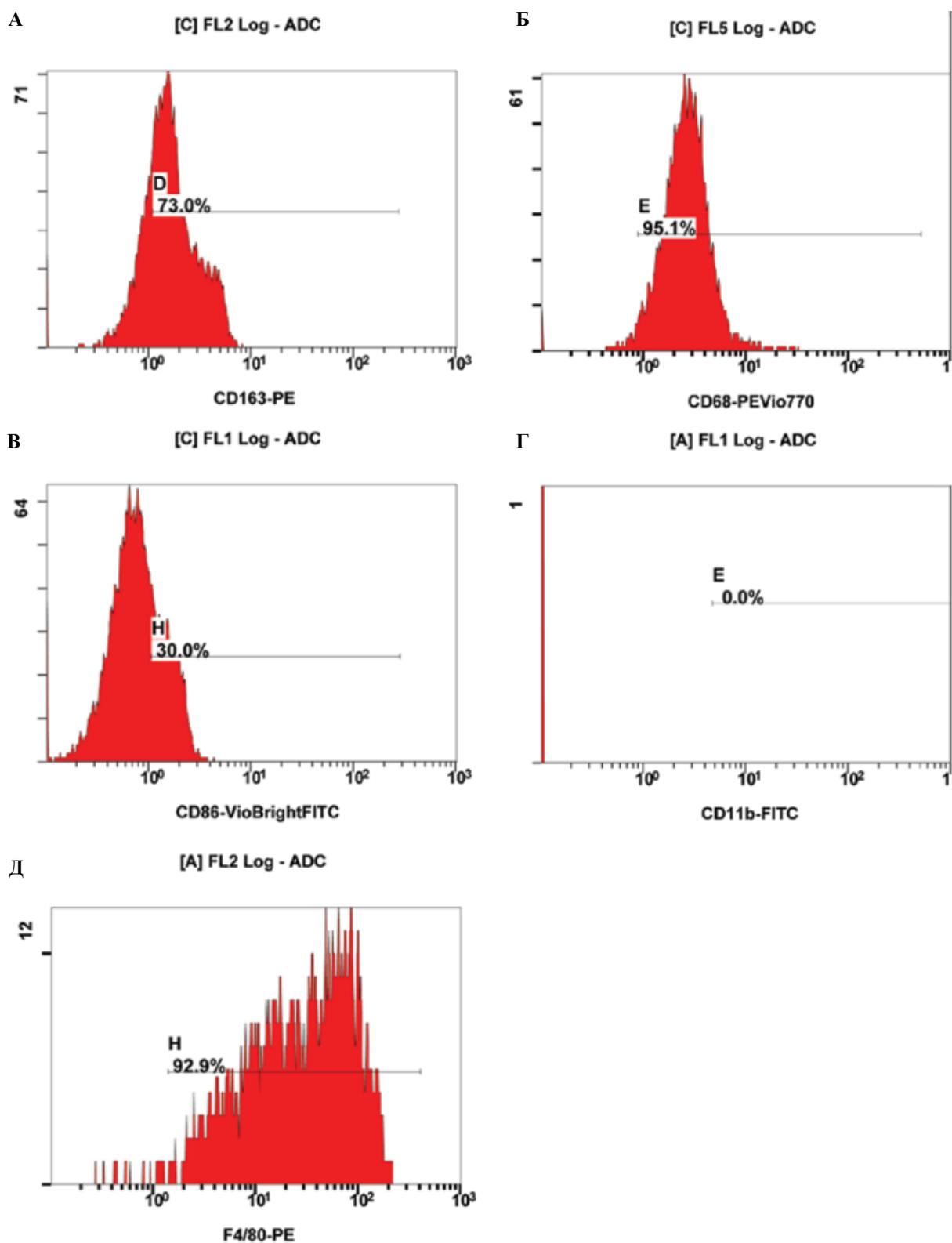


Рис. 2. Фенотип неактивированных клеток Купфера. Цитофлуориметрия.

А – количество клеток, экспрессирующих CD163, Б – количество клеток, экспрессирующих CD68, В – количество клеток, экспрессирующих CD86, Г – количество клеток, экспрессирующих CD11b, Д – количество клеток, экспрессирующих F4/80

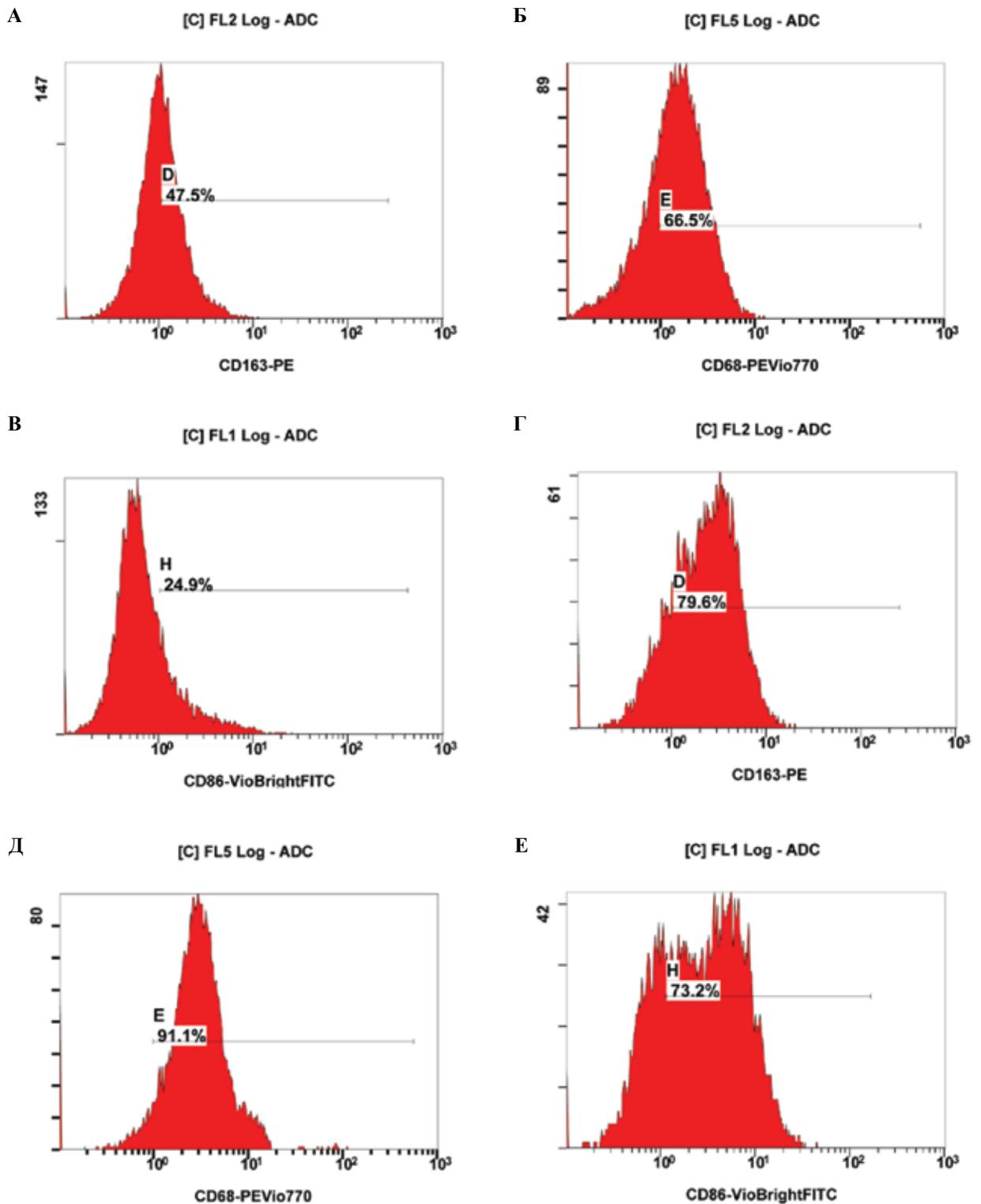


Рис. 3. Фенотип клеток Купфера, активированных в направлении M1 (А, Б, В) и M2 фенотипа (Г, Д, Е). Цитофлуориметрия. А, Г – количество клеток, экспрессирующих CD163, Б, Д – количество клеток, экспрессирующих CD68, В, Е – количество клеток, экспрессирующих CD86

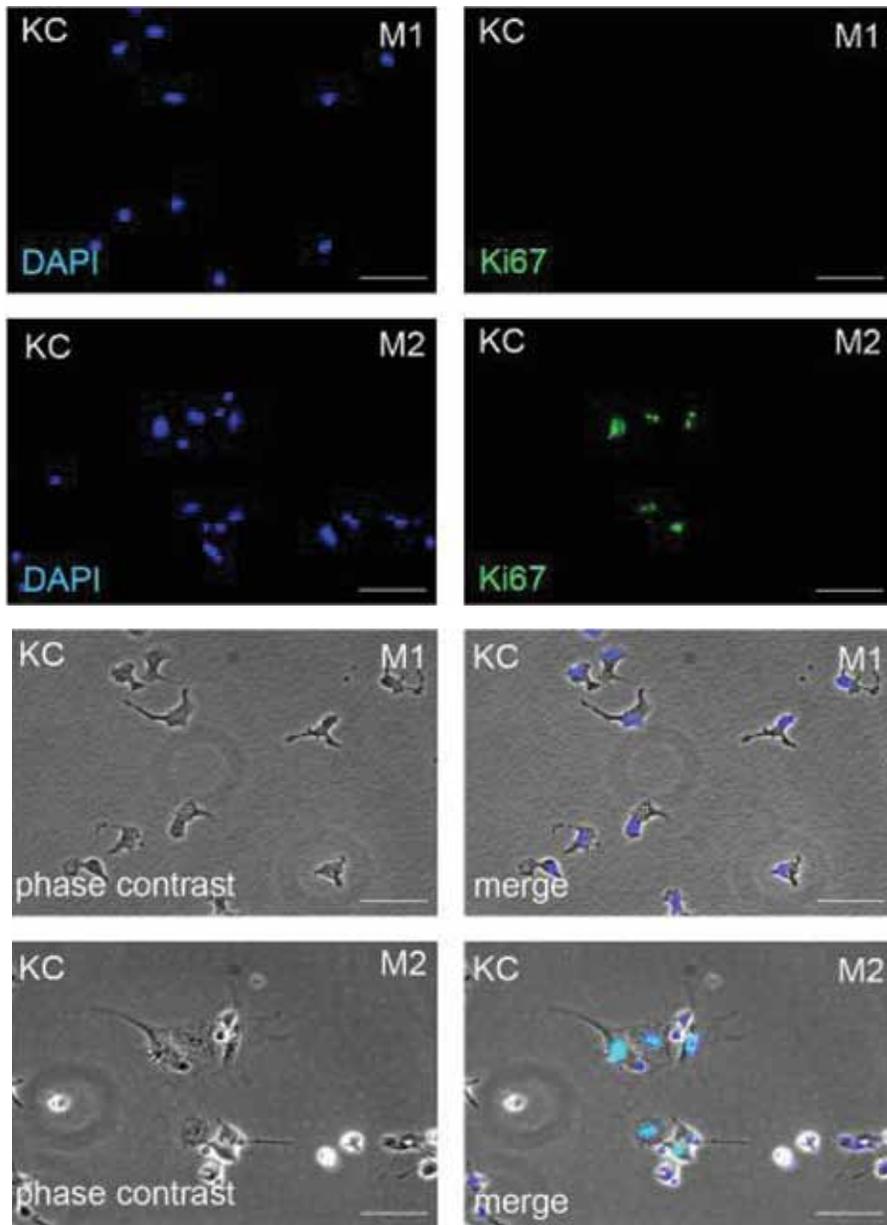


Рис. 4. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в резидентных макрофагах печени.

M1 – под влиянием индукторов M1 фенотипа, M2 – под влиянием индукторов M2 фенотипа.

Флуоресцентная микроскопия, Ki67 – зеленое свечение (FITC), ядра – синее свечение (DAPI), масштабный отрезок – 50 мкм

как при физиологических, так и при патологических состояниях. Однако в настоящее время остается непонятно, чем помимо поверхностных маркеров различаются макрофаги эмбрионального и костномозгового происхождения [4, 6]. На существующие различия в физиологии двух типов макрофагов указывает тот факт, что при остром повреждении печени парацетамолом или СС14 в нее мигрируют макрофаги костномозгового происхождения [17, 18]. На основании этого можно заключить, что наличие резидентных макрофагов в печени оказывается недостаточным для течения репаративного процесса в условиях токсического повреждения.

При изучении свойств резидентных макрофагов мы выявили ряд особенностей.

Выделенные из интактной печени макрофаги не экспрессировали CD11b, который рассматривается как маркер макрофагов моноцитарного происхождения, доля таких клеток в печени колеблется от 5% до 30% [13]. Таким образом, полученные данные подтверждают положение о том, что резидентные макрофаги печени представлены потомками гемопоэтических клеток не костномозгового происхождения. Выделенные макрофаги печени имели ряд особенностей в наборе экспрессируемых генов цитокинов. Обнаружено, что под влиянием факторов активации (как M1, так

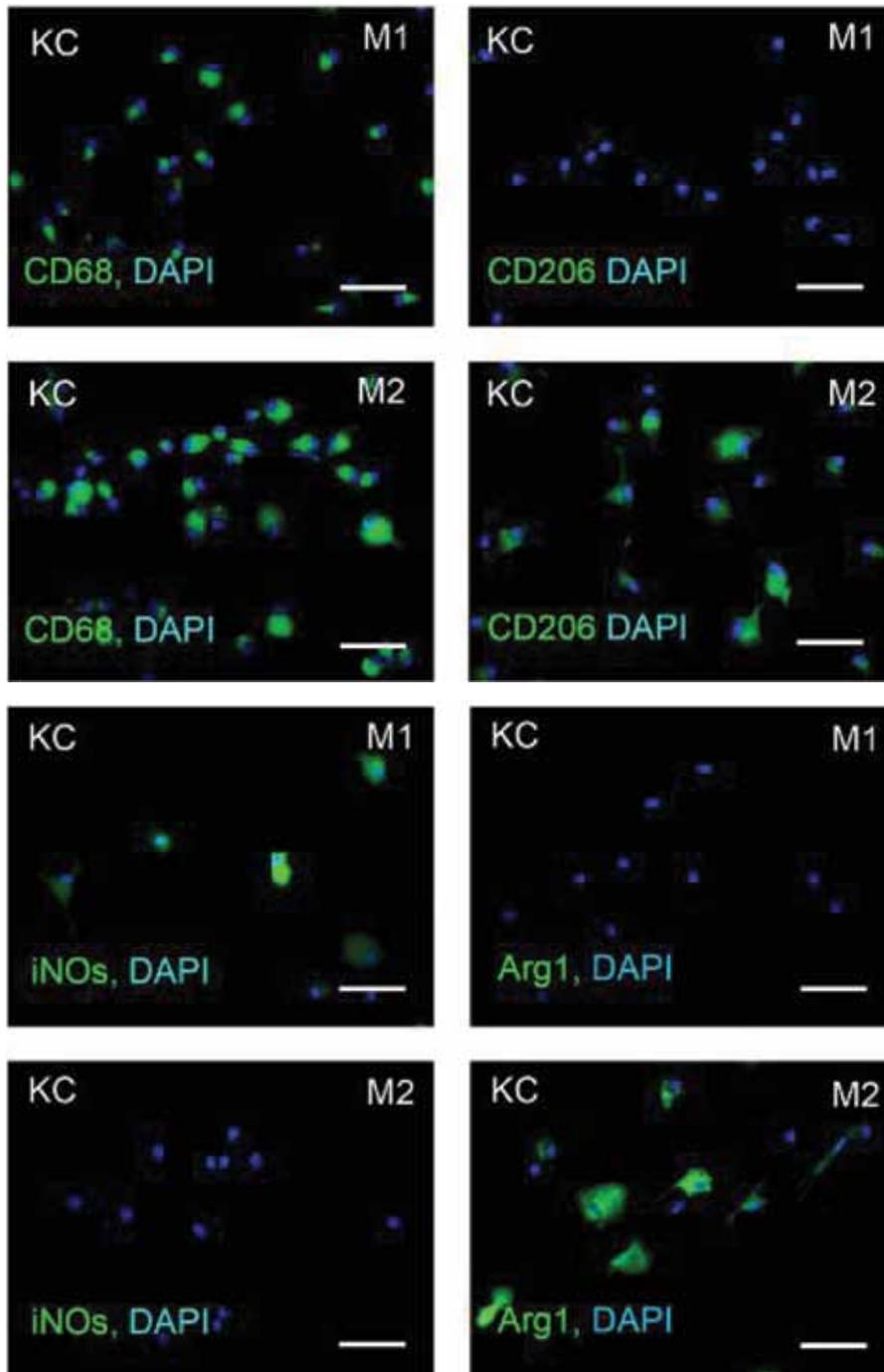


Рис. 5. Фенотип резидентных макрофагов печени (KC). M1 – под влиянием индукторов M1 фенотипа, M2 – под влиянием индукторов M2 фенотипа. Флуоресцентная микроскопия, Ki67 – зеленое свечение (FITC), ядра – синее свечение (DAPI), масштабный отрезок – 50 мкм

и M2 индукторов) в резидентных макрофагах печени увеличивается экспрессия генов в основном противовоспалительных цитокинов, таких как *il4*, *il10*, *il13*. Повышение экспрессии провоспалительных цитокинов либо отсутствовало (*il1b*), либо наблюдалось значительно позже (*tnfa*, *il12a*). Эти данные согласуются с результатами фенотипирования нативных макрофагов, большинство которых экспрессировало на своей по-

верхности CD163 – маркер M2 фенотипа, а также с данными других авторов, изучавших экспрессию *il1b* макрофагами печени [17]. Ранее нами было также обнаружено, что в ходе репаративной регенерации печени после субтотальной резекции у крыс популяция макрофагов регенерирующей печени представлена в основном клетками, несущими другой маркер M2 фенотипа CD206 [2].

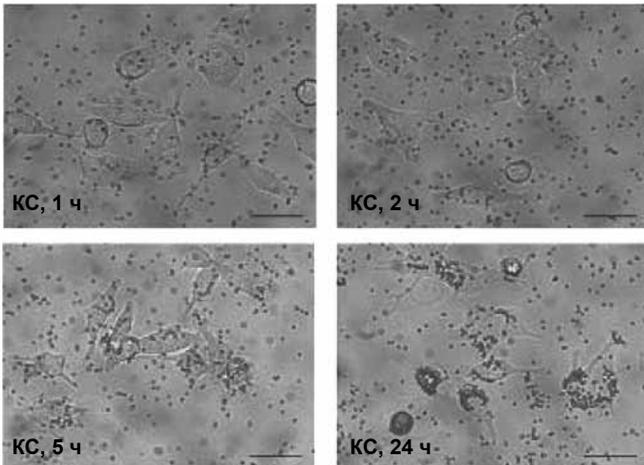


Рис. 6. Фагоцитарная активность неактивированных макрофагов печени. КС – неиндуцированные резидентные макрофаги печени через 1, 2, 5 и 24 часа после внесения латексных частиц. Фазово-контрастная микроскопия (phase contrast), масштабный отрезок – 50 мкм

В настоящее время роль П4 и П13 в регенерации печени мало изучена. Имеются единичные сообщения, что П4 играет ключевую роль в инициации пролиферации гепатоцитов [8], в то время как П13 регулирует пролиферацию холангиоцитов и активность фибробластов в печени [7].

Повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов *il1b*, *tnfa*, *il12a* в клетках Купфера отмечалось только спустя 3 суток после воздействия факторов активации макрофагов. Позднее начало экспрессии гена *tnfa*, возможно, лежит в основе сниженного содержания TNFα в печени крыс после субтотальной резекции, что приводит к нарушению пролиферации гепатоцитов [1, 5].

При остром токсическом повреждении в печени наблюдается выраженная фаза альтерации воспалительной реакции, для течения которой необходимы провоспалительные цитокины – П1b, TNFα [17, 18]. Отсутствие или позднее начало экспрессии генов *il*, *tnfa* резидентными макрофагами в условиях острого токсического повреждения печени, вероятно, приводит к миграции в нее макрофагов костномозгового происхождения.

Принято считать, что резидентные макрофаги печени обладают выраженной фагоцитарной активностью [3], однако мы обнаружили *in vitro* быстрое истощение фагоцитарных возможностей клеток Купфера, что также может быть причиной миграции в орган макрофагов костномозгового происхождения.

В научной литературе нет единого мнения о пролиферативном потенциале макрофагов [9, 18]. В настоящее время считается, что у макрофагов костномозгового происхождения способность к митотическому делению практически утрачена в отличие от макрофа-

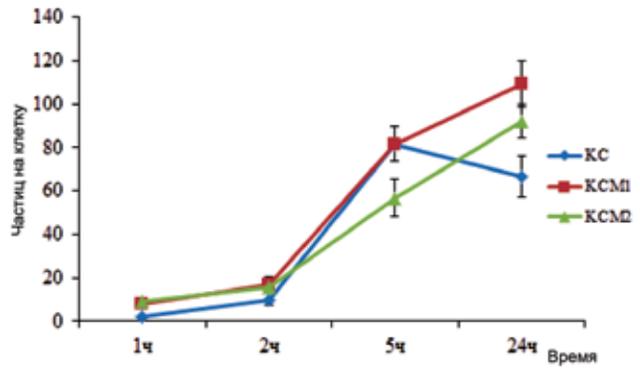


Рис. 7. Фагоцитарная активность неактивированных и активированных резидентных макрофагов печени.

КС – неиндуцированные макрофаги печени, КСМ1 – макрофаги, индуцированные средой с М1 факторами, КСМ2 с М2 факторами, по оси абсцисс – количество фагоцитированных силиконовых частиц на 1 клетку, по оси ординат – время

\* – статистически значимые различия по сравнению с неиндуцированными клетками Купфера,  $p < 0,05$

гов эмбрионального происхождения [9]. В своей работе мы установили, что пролиферирующие макрофаги наблюдаются только в условиях воздействия М2 факторов, которые включают М-CSF (колониестимулирующий фактор моноцитов) П4. Подобные особенности регуляции пролиферации резидентных макрофагов, видимо, лежат в основе того, что при токсическом повреждении популяция макрофагов печени временно восстанавливается за счет мигрирующих макрофагов костномозгового происхождения. Неспособность резидентных макрофагов печени к митотическому размножению в условиях ее токсического повреждения, возможно, связана с отсутствием в этом органе П4 [18].

### Заключение

При изучении профиля экспрессируемых генов, фенотипа и фагоцитарной активности мы обнаружили ряд особенностей резидентных макрофагов печени. Большая часть резидентных макрофагов печени имела фенотип  $F4/80^+$ ,  $CD68^+$ ,  $CD163^+$ ,  $CD11b^-$ . Индукция с помощью факторов М2 фенотипа приводила к повышению экспрессии  $CD86$ , а также появлению экспрессии  $Ki67$ . После активации М1 и М2 индукторами у резидентных макрофагов печени повышалась экспрессия в основном противовоспалительных цитокинов. Резидентные макрофаги печени обладали выраженной фагоцитарной активностью, которая затухала к 5 часам, однако добавление индукторов как М1, так и М2 фенотипа стимулировало фагоцитоз до 24 часов после внесения латексных частиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Соглашение № 17-04-01669/17).

## Литература

1. Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. Пролiferация и клеточная гибель гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 3. С. 22–30. [El'chaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh., Arutyunyan I.V., Kananykhina Ye.Yu., Makarov A.V., Bol'shakova G.B., Sukhikh G.T. Proliferatsiya i kletochnaya gibel' gepatotsitov posle subtotal'noy rezeksii pecheni kryys // Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya. 2016. V. 3. P. 22–30 (In Russ.)].
2. Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Усман Н.Ю., Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. Динамика количества М2-макрофагов при регенерации печени крыс // Молекулярная медицина. 2017. № 1. С. 45–50. [El'chaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh., Usman N.Yu., Arutyunyan I.V., Kananykhina Ye.Yu., Makarov A.V., Bol'shakova G.B., Sukhikh G.T. Dinamika kolichestva M2-makrofagov pri regeneratsii pecheni kryys // Molekulyarnaya meditsina. 2017. V. 1. P. 45–50 (In Russ.)].
3. Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease // Liver Int. 2006(Dec);26(10):1175–86.
4. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration // Immunobiology. 2014;219(3):172–8.
5. Elchaninov A. et al. Molecular Survey of Cell Source Usage during Subtotal Hepatectomy-Induced Liver Regeneration in Rats // PLoS One. 2016;11(9). e0162613. doi: 10.1371/journal.pone.0162613. eCollection.
6. Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J. Origin and functions of tissue macrophages // Immunity. 2014(Jul);41(1):21–35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.
7. Gieseck R.L., Ramalingam T.R., Hart K.M., Vannella K.M., Cantu D.A., Lu W.Y., Ferreira-González S., Forbes S.J., Vallier L., Wynn T.A. Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis // Immunity. 2016(Jul);45(1):145–58. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.009. Epub 2016 Jul 12.
8. Goh Y.P., Henderson N.C., Heredia J.E., Red Eagle A., Odegaard J.I., Lehwald N., Nguyen K.D., Sheppard D., Mukundan L., Locksley R.M., Chawla A. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration // Proc Natl Acad Sci U S A. 2013(Jun);110(24):9914–9. doi: 10.1073/pnas.1304046110. Epub 2013 May 28.
9. Jenkins S.J., Ruckerl D., Cook P.C., Jones L.H., Finkelman F.D., van Rooijen N., MacDonald A.S., Allen J.E. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation // Science. 2011(Jun);332(6035):1284–8. doi: 1126/science.1204351. Epub 2011 May 12.
10. Li P., He K., Li J., Liu Z., Gong J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases // Mol Immunol. 2017(May);85:222–9. doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.018. Epub 2017.
11. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 6:13. doi: 10.12703/P6-13. eCollection (2014).
12. Michalopoulos G.K. Advances in liver regeneration // Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014;8(8):897–907.
13. Nishiyama K., Nakashima H., Ikarashi M., Kinoshita M., Nakashima M., Aosasa S., Seki S., Yamamoto J. Mouse CD11b+Kupffer Cells Recruited from Bone Marrow Accelerate Liver Regeneration after Partial Hepatectomy // PLoS One. 2015(Sep) 2;10(9):e0136774. doi: 10.1371/journal.pone.0136774. eCollection 2015.
14. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.
15. Ruckerl D., Allen J.E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection // Immunol Rev. 2014(Nov);262(1):113–33. doi: 10.1111/imr.12221.
16. Vandesompele J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome Biol. 2002;3(7). research0034.1–research0034.11.
17. You Q. et al. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury // Biochem. Pharmacol. 2013;86(6): 836–43.
18. Zigmund E. et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury // J. Immunol. 2014;193(1):344–53.

## CHARACTERISTICS OF THE IMMUNOPHENOTYPE OF THE RESIDENT MACROPHAGES OF THE LIVER AND PROFILE OF EXPRESSED GENES

A.V. Lokhonina, A.S. Pokusaev, I.V. Arutyunyan, A.V. Elchaninov, A.V. Makarov, I.Z. Eremina, V.V. Surovtsev, G.B. Bolshakova, D.V. Goldshtein, T.Kh. Fatkhudinov

The profile of the expressed genes, phenotype and phagocytic activity of resident macrophages of the liver were studied. It was found that most of the resident liver macrophages were F4/80+, CD68+, CD163+, and CD11b-. Induction of M2 factor phenotypes increased CD86 expression as well as triggered Ki67 expression. After activation of M1 and M2 by inducers, resident liver macrophages enhanced the expression of main anti-inflammatory cytokines. Resident liver macrophages showed pronounced phagocytic activity, which faded up to 5 hours after the administration of latex particles, but the addition of inducers of both the M1 and M2 phenotype stimulated phagocytosis during 24 hours.

*Key words:* macrophages, liver, cytokines, phagocytosis

**Информация об авторах**

Лохонина Анастасия Вячеславовна – младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, г. Москва, ул. академика Опарина, д. 4. E-mail: nastya.serbsky@gmail.com

Покусаев Антон Сергеевич – научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 1456. E-mail: yume\_as@e1.ru

Арутюнян Ирина Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.

Адрес: 117997, Москва, ул. академика Опарина, д. 4. E-mail: labrosta@yandex.ru

Ельчанинов Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. академика Опарина, д. 4. E-mail: elchandrey@yandex.ru

Макаров Андрей Витальевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. академика Опарина, д. 4. E-mail: anvitmak@yandex.ru

Еремина Ирина Здиславовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии, эмбриологии Медицинского института Российского университета дружбы народов.

Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: eremina\_iz@rudn.university

Суровцев Виктор Васильевич – заместитель директора по инновациям Медицинского института Российского университета дружбы народов.

Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: real1sv@gmail.com

Большакова Галина Борисовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: gbolshakova@gmail.com

Гольдштейн Дмитрий Вадимович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: dv@gm7.ru

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией регенеративной медицины НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека, заведующий кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии Медицинского института Российского университета дружбы народов.

Адрес: 117997, Москва, ул. академика Опарина, д. 4. E-mail: fatkhudinov@gmail.com

Контакты: Фатхудинов Тимур Хайсамудинович

129323, Москва, ул. Снежная, д. 19, корп. 2, кв. 92. Телефон 8 (903) 256 1157. E-mail: fatkhudinov@gmail.com

*Материал поступил в редакцию 18 декабря 2017 года*

© Коллектив авторов, 2018

УДК: 577.218+577.216.9+616.65+57.05

# РЕГРЕСС ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИМФОЦИТАРНЫХ И ОРГАНЫХ РНК

*А.Г. Бабаева<sup>1</sup>, Н.В. Тишевская<sup>2</sup>, Н.М. Геворкян<sup>3</sup>, Е.С. Головнева<sup>2</sup>, Д.А. Максаков<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

На модели индуцированной сульпиридом доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс изучали корригирующий эффект препаратов суммарной РНК лимфоцитов селезенки интактных крыс, анемизированных крыс на стадии приобретения их лимфоцитами способности ингибировать цитогенез, а также препаратов суммарной РНК, полученной из клеток предстательной железы здоровых молодых половозрелых крыс и из пупочных канатиков 20-дневных плодов крысы. Морфологическое и морфометрическое исследование показало, что использованные препараты суммарной РНК обладают высокой корригирующей способностью и в течение короткого срока приводят к полной регрессии гипертрофии предстательной железы в целом и ее наиболее гипертрофированных дорсолатеральных отделов.

*Ключевые слова:* экспериментальная доброкачественная гиперплазия предстательной железы, сульпирид, суммарная РНК, лимфоциты

Ранее в опытах *in vitro* и *in vivo* нами было установлено, что морфогенетические свойства нормальных и активированных кровопотерей лимфоцитов реализуются посредством их суммарной РНК, которая вызывает в кроветворной ткани реципиентов изменения, аналогичные эффектам самих лимфоидных клеток при их адаптивном переносе [2–4, 9]. В частности, на моделях физиологического, компенсационного и угнетенного гемопоэза было показано, что под влиянием экзогенных лимфоцитарных РНК изменяется направление цитогенеза как в сторону стимуляции, так и в сторону ингибции, причем эти эффекты зависят от активности самих лимфоцитов, являющихся источником РНК. Важно отметить, что данный механизм РНК регуляции пролиферации и дифференцировки в костном мозге экспериментальных животных и в культурах эритроидных клеток работал очень эффективно: лимфоцитарные РНК оказывали корригирующее и лечебное действие при тяжелых нарушениях гемопоэза, вызванных бензолной интоксикацией или воздействием острого гамма-излучения [5, 8].

Мы полагаем, что открытые нами свойства РНК лимфоидных клеток – частный пример фундаментальных принципов межклеточных и межклеточных взаимодействий, подверженных регуляторному влиянию со стороны лимфоидной системы, являющейся, как известно, одним из центральных звеньев управления процессами

регенерации. В связи с этим в настоящей работе были поставлены следующие задачи: 1) доказать, что обнаруженные регуляторные свойства лимфоцитарных РНК не ограничиваются влиянием лишь на кроветворные клетки, а распространяются и на клетки других гистотипов; 2) подтвердить на примере паренхиматозного органа, что не только лимфоидные клетки, но, как было показано нами на примере эритропоэза [6], и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) воздействуют на процессы пролиферации клеток посредством механизмов РНК сигнализации; 3) доказать, что ингибирующая гемопоэз лимфоцитарная РНК может подавлять гиперпролиферативные процессы в паренхиматозных органах.

Для решения поставленных задач в качестве объекта исследования выбрана предстательная железа (ПрЖ) крыс с индуцированной сульпиридом доброкачественной гиперплазией (ДГПЖ), поскольку именно эта экспериментальная модель рекомендована Национальным руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств в качестве модели для тестирования эффективности препаратов, предлагаемых для лечения гиперплазии ПрЖ и простатитов у человека [7].

## Материалы и методы

Работа выполнена на 29 белых беспородных крысах-самцах весом 360–410 граммов в возрасте 14–15 меся-

цев, ранее использовавшихся в виварии для получения потомства. Важно отметить, что изначально в эксперимент были взяты еще шесть здоровых более молодых самцов (в возрасте 8–9 месяцев), у которых, однако, воспроизвести описанную ниже экспериментальную модель нам не удалось. У 22 из 29 использованных в опыте крыс экспериментально была воспроизведена гипертрофия предстательной железы по методу Т.Г. Боровской с соавт. [7]. Подопытным крысам (n=22) ежедневно в течение 30 дней внутримышечно вводили сульпирид (Sanofi Winthrop Industrie, Франция) в дозе 40 мг/кг веса тела, длительное использование которого, как известно, вызывает у крыс гиперсекрецию пролактина, стимулирующего развитие доброкачественной гиперплазии ПрЖ [7, 11]. Контрольной группе животных (n=7) с такой же частотой внутримышечно вводили по 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. Через 10 дней после последней инъекции сульпирида 15 крысам с ДГПЖ начали вводить препараты суммарной РНК. С лечебной целью были использованы четыре разновидности суммарной РНК: 1) РНК лимфоидных клеток селезенки интактных крыс (РНКс-1); 2) РНК лимфоидных клеток селезенки анемизированных крыс, выделенная через 96 часов после 2% кровопотери и обладающая ингибирующей цитогенез активностью (РНКс-3); 3) РНК клеток предстательной железы молодых половозрелых интактных крыс (РНКпр/ж); 4) РНК клеток пупочных канатиков 20-дневных плодов крыс (РНКпуп).

На первом этапе крысам с ДГПЖ внутривнутрино одновременно ввели два препарата – РНКс-1 и РНКпр/ж в одинаковой ранее установленной лечебной дозе (15 мкг на 100 г веса) [5, 8]. Через 14 дней после указанной манипуляции подопытным животным внутривнутрино в указанных выше дозах были повторно введены препараты РНК: крысам группы 1 (n=5) – РНКс-1 и РНКпр/ж; крысам группы 2 (n=5) – РНКс-3. Крысам группы 3 (n=5) была введена РНКпуп в установленной лечебной дозе (8 мкг на 100 г веса). Семь крыс из 22, подвергнутых воздействию сульпирида, были использованы в качестве динамического контроля ДГПЖ. Через 28 дней после последнего введения РНК все животные выведены из эксперимента.

Эксперимент проводили в соответствии с национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009). Все манипуляции с животными, включая эвтаназию путем цервикальной дислокации, производили под эфирным наркозом.

Для оценки эффективности влияния исследуемых РНК определяли абсолютную и относительную массу всей ПрЖ и ее дорсолатеральных отделов. Для морфологического исследования ткань дорсолатеральных отделов простаты фиксировали в 10% растворе формалина и подвергали стандартной гистологической об-

работке с последующей окраской парафиновых срезов гематоксилином и эозином. Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной системы анализа цветового изображения: микроскопа Leica DMRXA (Германия), системы анализа изображения Диаморф Цито® (Россия) и комплекта компьютерных программ Диаморф Ипсo® (Россия). В каждом препарате во всех полях зрения по методу Автандилова [1] измеряли общую площадь, занимаемую железистой тканью, толщину эпителиального слоя, площади ядра и цитоплазмы. Для определения площади цитоплазмы и ядер клеток использовали пункт меню «ручное выделение объектов». С помощью инструмента «замкнутый многоугольник» на экране обводили контур всей клетки и контур ядра. Вычислив затем разницу между площадью всей клетки и площадью ядра, получали величину площади цитоплазмы. В каждом гистологическом срезе было проанализировано 100 клеток в 10 полях зрения. Ядерно-цитоплазматическое соотношение для каждой клетки определяли при делении площади ядра на площадь цитоплазмы.

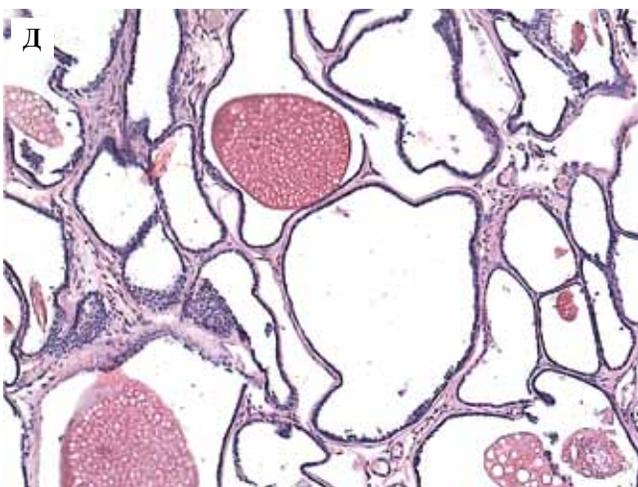
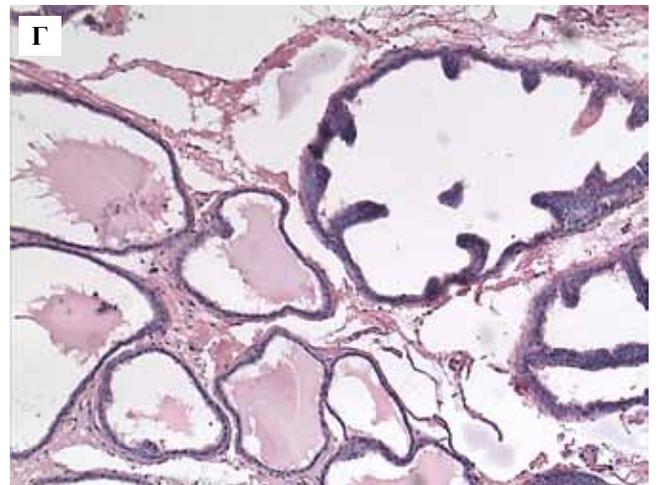
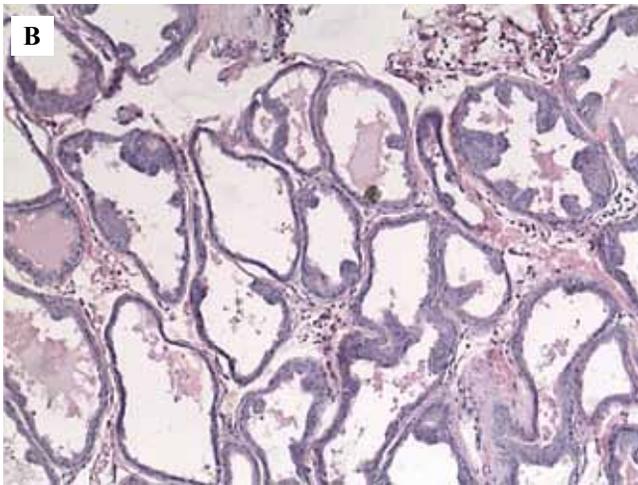
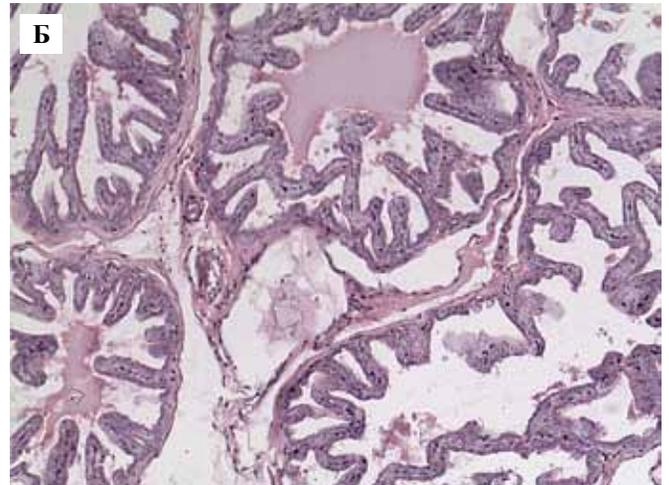
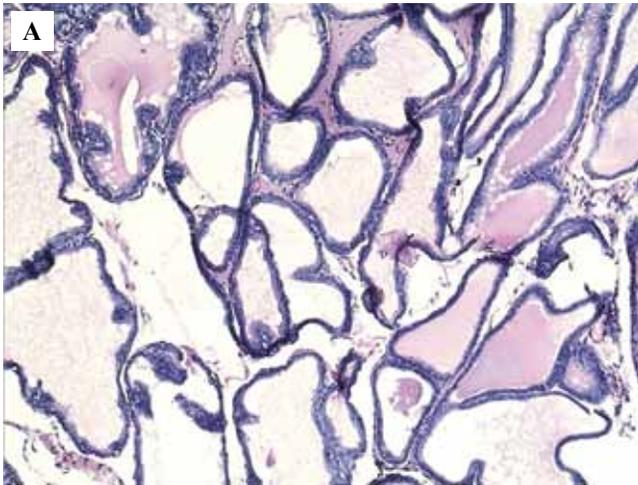
Полученные результаты обрабатывали методами описательной статистики с расчетом средних значений, ошибки среднего, доверительных интервалов, стандартного отклонения. Сравнения групп проводились методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна–Уитни и  $\chi^2$  Пирсона.

## Результаты и обсуждение

В ПрЖ крыс различают дорсолатеральные и вентральные доли, которые отличаются по размеру, диаметру, гистоструктуре и функциональному назначению [10]. Различаются эти доли и по своей реактивности, в частности на введение сульпирида.

После 30-дневного введения сульпирида абсолютная и относительная масса ПрЖ значительно увеличилась по сравнению с аналогичными показателями в интактном контроле, однако это увеличение было неравномерным. На фоне умеренного прироста абсолютной (на 18%) и относительной (на 34%) массы всей железы гипертрофия дорсолатеральных отделов была выражена более значительно: их абсолютная масса возросла на 80%, относительная – на 100%.

Анализ гистоструктуры ПрЖ интактного и динамического контроля свидетельствовал о достоверном увеличении массы железистой ткани, что подтверждают как микрофотографии (рис. 1 А, Б), так и данные морфометрии (табл., рис. 2). Тем не менее, какова степень участия в увеличении массы железистой ткани процессов пролиферации, неизвестно, так как пролиферативная стадия ДГПЖ нами не изучалась, а уровень пролиферативных процессов разработчиками модели ДГПЖ не указан. На рассматриваемом нами завершающем этапе развития ДГПЖ ни единичные митозы, ни очаги пролиферации не выявлены. В то же время нами обнаружена выраженная гипертрофия клеток железистого эпителия за счет увеличения их



*Рис. 1.* Структура дорсолатеральной доли предстательной железы у крыс. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .  
 А – в норме, Б – при гипертрофии, вызванной сульфипридом,  
 В – при лечении препаратами гомологичной РНК и РНК из лимфоцитов нормальной селезенки,  
 Г – при лечении препаратами гомологичной РНК, РНК из лимфоцитов нормальной селезенки и РНК из пуповины,  
 Д – при лечении препаратами гомологичной РНК, РНК из лимфоцитов нормальной селезенки и селезенки анемизированных крыс на этапе торможения процесса регенерации

цитоплазмы. По данным морфометрии толщина эпителиального слоя ацинусов увеличилась на 40%, площадь цитоплазмы железистых клеток – более чем на 50% по сравнению с соответствующими показателями в группе интактного контроля (табл.), в результате чего доля железистой ткани в простате крыс с сульфипридной моделью ДГПЖ возросла с 48,2% (интактный контроль) до 71,1% (ДГПЖ) (рис. 2).

При морфологическом исследовании ПрЖ крыс, получивших препараты РНК, установлено, что под влиянием двукратного введения препаратов суммарной РНК у животных всех трех опытных групп наблюдались качественно одинаковые изменения в ПрЖ: масса всей железы и ее дорсолатеральных отделов уменьшилась, структурные показатели состояния ткани простаты достоверно снизились (табл.).

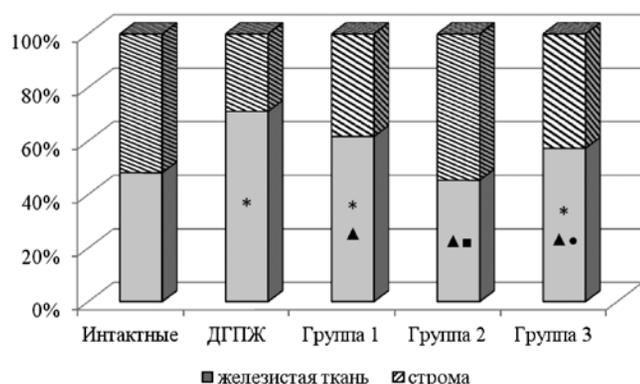


Рис. 2. Изменение процентного соотношения железистой ткани и стромы в предстательной железе крыс с ДГПЖ после введения РНК

\* – достоверность различий по отношению к интактной группе  
 ▲ – достоверность различий по отношению к группе с ДГПЖ  
 ■ – достоверность различий по отношению к группе 1  
 ● – достоверность различий между группами 2 и 3

Полученные данные указывают на то, что под влиянием экзогенной РНК в ПрЖ крыс с ДГПЖ достоверно уменьшились доля железистой ткани, толщина выстилающего ацинусы эпителия и площадь цитоплазмы в железистых клетках (рис. 1 А–Д). Важно отметить, что введение крысам с ДГПЖ ингибирующей гемопоз РНКс-3 вызвало, судя по микроскопическим признакам и данным морфометрии, более выраженную регрессию гиперпластического процесса в ПрЖ и дистрофию железистого эпителия, граничащую с атрофией (рис. 1 Д).

При анализе гистоструктуры ПрЖ у подопытных крыс особого внимания заслуживают не только признаки благотворного действия препаратов РНК на орган, но и отсутствие нежелательных последствий. Это касается прежде всего того, что использованные препараты РНК не вызвали изменений, приводящих к уменьшению массы ПрЖ за счет крупноочаговой гибели ткани или утраты ее морфологической спец-

Таблица

**Влияние препаратов РНК на морфологические и морфометрические показатели предстательной железы крыс с экспериментальной ДГПЖ**

Характеристики	Группы животных				
	интактные (n=7)	ДГПЖ (n=7)	группа 1 (РНКс-1 + РНКпр/ж) × 2 (n=5)	группа 2 (РНКс-1 + РНКпр/ж) + РНКс-3 (n=5)	группа 3 (РНКс-1 + РНКпр/ж) + РНКпуп. (n=5)
Вес крыс, г	431,0±13,5 [100%]	390,8±18,1 [90,67%]	383,8±12,4 [89%]	366,3±19,8 [84,99%]	395,3±28,7 [91,72%]
Абсолютная масса ПрЖ, г	2,87±0,26 [100%]	3,38±0,18 [117,77%]	2,64±0,24▲ [91,99%]	2,13±0,34▲ [74,22%]	2,32±0,06▲ [80,84%]
Абсолютная масса дорсолатеральных отделов ПрЖ, г	0,98±0,10 [100%]	1,77±0,04* [180,61%]	0,88±0,09▲ [89,8%]	0,86±0,09▲ [87,76%]	0,71±0,18▲ [72,45%]
Относительная масса ПрЖ, %	0,665±0,056 [100%]	0,892±0,065 [134,14%]	0,681±0,049 [102,4%]	0,579±0,088▲ [87,07%]	0,599±0,052▲ [90,08%]
Относительная масса дорсолатеральных отделов ПрЖ, %	0,226±0,017 [100%]	0,452±0,007* [200%]	0,227±0,18▲ [100,44%]	0,266±0,056▲ [117,7 %]	0,189±0,05▲ [83,63%]
Толщина эпителия, мкм	20,4±0,3 [100%]	28,9±0,5* [141,66%]	23,2±0,1*▲ [113,73%]	18,2±0,1*▲■ [89,22%]	22,5±0,2*▲● [110,29%]
Площадь ядра, мкм <sup>2</sup>	24,1±0,02 [100%]	24,3±0,01 [100,83%]	23,9±0,04 [99,17%]	24,2±0,02 [100,41%]	24,2±0,06 [100,41%]
Площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	52,1±0,02 [100%]	81,2±0,01* [155,85%]	67,5±0,04*▲ [129,56%]	51,9±0,02▲■ [99,62%]	65,8±0,06*▲● [126,3%]
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,46±0,02 [100%]	0,30±0,02* [65,22%]	0,35±0,04*▲ [76,09%]	0,46±0,02▲■ [100%]	0,36±0,06*▲● [78,26%]

Данные представлены в виде M±m

\* – достоверность различий по отношению к интактной группе  
 ▲ – достоверность различий по отношению к группе с ДГПЖ  
 ■ – достоверность различий по отношению к группе 1  
 ● – достоверность различий между группами 2 и 3

в квадратных скобках указан процент изменения показателя относительно интактного контроля

ифичности: регресс признаков гиперплазии произошел за счет диффузной равномерной дистрофии клеток. После воздействия препаратами РНК ПрЖ в общих чертах сохранила архитектонику железистого органа (рис. 1), хотя и несколько измененного. Следовательно, уменьшение массы железы, сопровождающееся соответствующей нормализацией морфометрических показателей, и относительная сохранность ее гистологического строения у подопытных животных свидетельствуют о том, что препараты РНК обладают выраженным корригирующим и стабилизирующим действием в отношении citoархитектоники паренхиматозных органов.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что препараты суммарной РНК лимфоцитов селезенки как интактных, так и анемизированных крыс на стадии приобретения их лимфоцитами ингибирующих цитогенез свойств в комплексе с гомологичной органной РНК вызывают быструю интенсивную регрессию гипертрофии предстательной железы, осуществляющейся в значительной мере за счет редукции цитоплазмы железистого эпителия. Особо следует отметить, что повторное введение не органной РНК, а РНК активированных лимфоцитов вызывает существенное уменьшение гипертрофии ПрЖ. Это может означать, что лимфоцитарная РНК играет первостепенную роль при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы.

Сравнительный анализ эффективности трех исследованных нами комбинаций препаратов суммарной РНК дает основание утверждать, что все они оказывают заметное корригирующее действие на гипертрофированную предстательную железу, однако комбинация, включающая в себя препарат РНКс-3, вызывает достоверно более выраженную регрессию признаков гипертрофии ПрЖ. Этот факт свидетельствует о том, что, во-первых, лимфоцитарная РНК обладает плеiotропным действием, влияя на структурные характеристики негомологичной (железистой) ткани, а во-вторых, направленность действия РНК соответствует направленности действия лимфоцитов, из которых она выделена, и, следовательно, может быть использована вместо лимфоцитов в лечебных целях.

### Литература

1. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. М.: Медицина. 1990. 384 с. [*Avtandilov G.G.* Medical morphometry. M.: Medicine, 1990. 384 p. (In Russ.)].
2. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А.* Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд-во РАМН. 2009. 108 с. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov Ye.A.* The role of lymphocytes in the operative change in the program of tissue development. M.: Publishing house RAMS, 2009. 108 p. (In Russ.)].
3. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А.* Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток

селезенки крыс на эритропоэз *in vitro* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 4. С. 35–39. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A.* Effect of total RNA preparations of the rat spleen lymphoid cells on erythropoiesis *in vitro* // Clinical and experimental morphology. 2014. V. 4. P. 35–39. (In Russ.)].

4. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А.* Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 4. С. 40–43. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A.* Influence of total RNA preparations of spleen lymphoid cells on erythropoiesis in culture of erythroblastic islet of rats with polycythemia // Clinical and experimental morphology. 2014. V. 4. P. 40–43. (In Russ.)].
5. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.А., Рагимов А.А.* О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров // Онкогематология. 2015. № 2. С. 58–62. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Yu.A., Ragimov A.A.* About hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors // Oncohematology. 2015. V. 2. P. 58–62. (In Russ.)].
6. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В.* Эритропоэтическая активность суммарной РНК клеток плаценты *in vitro* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 4. С. 31–35. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V.* Erythropoietic activity of total RNA of placenta cells *in vitro* // Clinical and experimental morphology. 2016. V. 4. P. 31–35. (In Russ.)].
7. *Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Дурнев А.Д., Удут В.В., Пахомова А.В., Юрмазов З.А., Дыгай А.И.* Методические рекомендации по доклиническому изучению простатотропной активности лекарственных средств: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, 2012. С. 727–739. [*Borovskaya T.G., Fomina T.I., Durnev A.D., Udut V.V., Pakhomova A.V., Yurmazov Z.A., Dygay A.I.* Methodical recommendations on the preclinical study of the prostatotropic activity of pharmaceuticals // A guide to conducting preclinical studies of pharmaceuticals. Part 1. M.: FGBU “NCEMPS” Ministry of Health and Social Development of Russia, 2012. P. 727–739. (In Russ.)].
8. *Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А.* Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого  $\gamma$ -облучения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. № 5, Т. 161. С. 670–673. [*Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A.* Effect of preliminary introduction of total RNA of bone marrow cells on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute  $\gamma$ -irradiation // Bulletin of experimental biology and medicine. 2016. V. 5. No. 161. P. 670–673. (In Russ.)].
9. *Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А.* Влияние суммарной РНК лимфо-

- идных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. № 4. Т 101. С. 451–461. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Yu.M., Kozlova N.I., Bolotov A.A. Influence of the total RNA of lymphoid cells of the spleen on erythropoiesis under experimental polycythemia // Russian Journal of Physiology named for Sechenov. 2015. V. 4. No. 101. P. 451–461. (In Russ.)].
10. Цветков И.С., Макарова О.В., Мхитаров В.А. Структурно-функциональная характеристика предстательной железы крыс // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 4. С. 69–74. [Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Mkhitarov V.A. Structural and Functional Characteristics of the Prostate Gland of the Rat // clinical and experimental morphology. V. 4. 2013. P. 69–74. (In Russ.)].
11. Van Coppenole F., Slomianny C., Carpentier F. et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(1):120–9.

## REGRESSION OF EXPERIMENTAL BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA UNDER THE INFLUENCE OF RNA FROM LYMPHOCYTES AND ORGANS

A.G. Babaeva, N.V. Tishevskaya, N.M. Gevorkyan, E.S. Golovneva, D.A. Maksakov

Preparations of total RNA were isolated from spleen lymphocytes of intact rats, rats after hemorrhage at the stage when their lymphocytes acquire the ability to inhibit cytogenesis as well as from prostatic cells of healthy young adult rats and from the umbilical cord of 20-day-old rat embryos. The correcting effect of RNA preparations was studied in the rat model of benign prostatic hyperplasia induced by sulpiride. Morphological and morphometric examination showed that the administration of above total RNA preparations had a high correcting capacity and within a short time lead to the complete regression of hypertrophy of the prostate gland as a whole and of its most hypertrophied dorsolateral regions.

*Key words:* experimental benign prostatic hyperplasia, sulpiride, total RNA, lymphocytes

### Информация об авторах

Бабаева Анна Георгиевна – доктор медицинских наук, академик РАЕН, консультант лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Тишевская Наталья Викторовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Геворкян Нина Михайловна – научный сотрудник лаборатории биосинтеза белков НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.

Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

Головнева Елена Станиславовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Максаков Дмитрий Александрович – очный аспирант кафедры нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Контакты: Нина Михайловна Геворкян.

Телефон 8 916 652 3203. E-mail: gevorkiann@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 26 апреля 2017 года

# МНОГОСЛОЙНОЕ МУЦИНПРОДУЦИРУЮЩЕЕ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЕ ПОРАЖЕНИЕ ШЕЙКИ МАТКИ

*М.В. Шамаракова, А.В. Асатурова, Л.С. Ежова, А.В. Козаченко*

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

Целью исследования был систематический анализ данных литературы о многослойном муцинпродуцирующем интраэпителиальном поражении SMILE (англ. stratified mucinproducing intraepithelial lesion) – предраковом изменении эпителия шейки матки. В обзор включены данные зарубежных и отечественных статей, опубликованных в Pubmed в течение последних 20 лет.

SMILE представляет собой многослойное интраэпителиальное поражение, состоящее из атипических клеток, содержащих муцин в переменном количестве. При иммуногистохимическом исследовании в SMILE наблюдаются высокая экспрессия ki-67, негативная или резко сниженная экспрессия маркеров кератина 14 и p63, диффузная иммунореактивность в отношении p16INK4a. Описаны наблюдения инвазивной карциномы у отдельных пациенток с метастатическим поражением органов брюшной полости и легких, имеющей структурное сходство со SMILE. Цитологические признаки SMILE включают присутствие пластов клеток со «скупенными» ядрами, увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением, легкой атипией ядер. Возникновение SMILE связывают с пролиферацией мультипотентной стволовой/резервной клетки переходной зоны шейки матки.

Сделано следующее заключение. SMILE – редкая цервикальная интраэпителиальная неоплазия эндоцервикального типа, ассоциированная с инфицированием вирусом папилломы человека и способная к прогрессированию в инвазивный рак.

*Ключевые слова:* цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), плоскоклеточное интраэпителиальное поражение (SIL), аденокарцинома *in situ* (AIS), многослойное муцинпродуцирующее интраэпителиальное поражение (SMILE)

SMILE – многослойное муцинпродуцирующее интраэпителиальное поражение (англ. stratified mucinproducing intraepithelial lesion) – представляет собой многослойное интраэпителиальное поражение, состоящее из атипичных клеток, содержащих муцин. Последний располагается в виде отдельных крупных капель или мелких вакуолей, образующих просветление вокруг ядер. Количество муцина в SMILE переменное: выявляются «богатые» муцином поражения с обильным его включением в большинстве клеток и «бедные» с единичными муцинсодержащими клетками, при этом характерное просветление между ядрами клеток несколько уменьшается, отмечается повышенная плотность атипичных клеток, имеющая сходство с CIN3 (цервикальная интраэпителиальная неоплазия 3-й степени тяжести) при малом увеличении микроскопа. Следует отметить, что в SMILE обнаружено позитивное окрашивание муцикармином. SMILE отличаются плавным округлым контуром, изредка с распространением в эндоцервикальные крипты с частичным или полным заполнением последних. Митозы и апоптози-

ческие тельца отмечаются во всех слоях эпителиального пласта [11, 16].

При проведении иммуногистохимического исследования Park et al. в образцах SMILE выявили высокую экспрессию ki-67, негативную либо резко сниженную экспрессию маркеров кератина 14 и p63. ki-67 представляет собой маркер пролиферативной активности, высокая экспрессия которого наблюдается в CIN и отсутствует в метапластическом эпителии шейки матки [1, 17]. Кератин 14 принято считать биохимическим маркером многослойного плоского эпителия с его высокой экспрессией в клетках базального, митотически активного слоя многослойного плоского эпителия и всех CIN. Высокие уровни экспрессии протеина p63, аналога p53, наблюдаются в базальных клетках многослойного плоского эпителия и в клетках, способных дифференцироваться в многослойный плоский эпителий [19, 21]. На основании этого авторы сделали заключение, что SMILE является цервикальным интраэпителиальным поражением, которое, несмотря на многослойное строение, следует относить к эндоцерви-

кальной неоплазии [16]. Вследствие этого в 2014 году SMILE включили в классификацию опухолей женской репродуктивной системы ВОЗ в раздел железистых новообразований шейки матки в качестве варианта аденокарциномы *in situ* (AIS) [10].

Boyle et al. в препаратах SMILE установили диффузную иммунореактивность в отношении маркера p16INK4a, подтверждающую его ассоциацию с вирусом папилломы человека (ВПЧ), аналогично CIN и AIS [4]. Boyle et al., напротив, обнаружили позитивное окрашивание инсулиноподобного фактора роста 3-го типа (IMP3) в AIS, отрицательное – в эндоцервикальных криптах, CIN и SMILE, указывающее на большее иммунофенотипическое сходство SMILE и CIN по сравнению с AIS [4, 12].

SMILE, как правило, сосуществует с другими предраковыми поражениями и карциномами шейки матки. В исследовании Park et al. среди 18 пациенток, в препаратах шейки матки которых были выявлены морфологические признаки SMILE, у 14 женщин обнаружены структурные особенности CIN2-3, у 11 – AIS, у четырех – эндоцервикальная аденокарцинома, у одной – сочетание SMILE с плоскоклеточной карциномой и эндоцервикальной аденокарциномой, у пяти – аденосквамозная карцинома, у одной – папиллярная плоскоклеточная неоплазия, у одной – папиллярная плоскоклеточная неоплазия и эндоцервикальная аденокарцинома. Все женщины были в возрасте от 23 до 57 лет. Средний возраст пациенток со SMILE без признаков инвазивной карциномы составил 34,5 года, а со SMILE и инвазивной карциномой – 41,8 года.

Boyle et al. при анализе архивного материала, собранного за шесть лет, обнаружили SMILE в 69 образцах (50 петлевых эксцизий и 19 биоптатов) от 60 женщин в возрасте 20–58 лет [4]. Из 19 биоптатов шейки матки структурные особенности изолированных SMILE были обнаружены у двух женщин, у 14 пациенток наблюдались признаки SMILE и HSIL (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести), у трех – сочетание SMILE с HSIL и AIS. В препаратах петлевой эксцизии 16 из 19 женщин, проведенной в среднем через 60 дней после обнаружения в биопсийном материале SMILE, последнее было подтверждено лишь у девяти пациенток, у одной выявлена плоскоклеточная карцинома, у одной – AIS, у 13 – HSIL. У двух пациенток со SMILE в биоптатах шейки матки, в образцах петлевой эксцизии диагностированы SMILE и HSIL.

Гистологическое исследование ткани, полученной при петлевой эксцизии шейки матки у 50 женщин, выявило ассоциацию SMILE и цервикального рака у семи пациенток, при этом эндоцервикальная карцинома стадии IA2 по FIGO диагностирована у одной женщины, у остальных – плоскоклеточная карцинома стадии IA1. AIS обнаружена у 29 женщин, HSIL – у 64. Сочетание SMILE, HSIL и AIS наблюдалось у 21 па-

циентки, SMILE явилось единственным предраковым изменением у одной женщины.

Lastra et al. кроме выявленных SMILE в препаратах шейки матки семи женщин в возрасте от 22 до 40 лет сообщили об инвазивной форме SMILE, диагностированной у восьми пациенток 34–64 лет. Десмопластическая реакция, обширное вовлечение эндоцервикальных крипт, деструктивный или инвазивный рост наблюдались во всех образцах. Инвазия стромы представляла собой гнезда многорядных цилиндрических клеток с бледными округлыми или овальными ядрами, не имеющими выраженных ядрышек. Нередко ядра периферических клеток располагались в форме частокола. Аналогично SMILE, содержание цитоплазматического муцина было различным – визуализировались «богатые» и «бедные» им опухоли. Митозы и апоптотические тельца в очагах инвазии выявлены во всех случаях. Вследствие структурного сходства со SMILE эта опухоль названа инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномой.

Рак с морфологическими признаками многослойной муцинпродуцирующей карциномы диагностирован у пяти женщин. Глубина инвазии рака составляла от 8 до 19 мм у четырех пациенток и менее 1 мм в трех случаях. У двух пациенток с глубокой инвазией обнаружено распространение в параметральную клетчатку и в последующем метастазы в легких, имеющие структурные особенности инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномы. У одной пациентки отмечалось сочетание инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномы и эндоцервикальной аденокарциномы, при этом морфологические признаки инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномы визуализировались в непосредственной близости от SMILE, а отдельно расположенные очаги эндоцервикальной аденокарциномы – около AIS. Признаки кератинизации или межклеточных мостиков не обнаружены ни в одном из восьми наблюдений.

В материале семи пациенток наряду с инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномой выявлены интраэпителиальные изменения, представленные SMILE (пять случаев), SMILE и AIS (один), SMILE, AIS и HSIL (один). У последней женщины рак имел признаки исключительно инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномы.

У трех из четырех пациенток с инвазивной многослойной муцинпродуцирующей карциномой в последующем обнаружены метастазы, имеющие ее структурные особенности: у одной – в органы брюшной полости, у двух других – в легкие [11].

Подобное исследование провели Onishi et al., сообщившие о 12 наблюдениях SMILE у женщин 30–66 лет (средний возраст 44 года), составивших 2,7% от всех пациенток с опухолями и предраковыми изменениями шейки матки в течение десятилетнего периода. У трех из них (30–48 лет) диагностировано интраэпителиаль-

ное поражение, у девяти (37–66 лет) – признаки инвазивного рака [14].

По данным литературы, ни у одной пациентки с гистологически верифицированным SMILE последнее не было установлено при ранее выполненном цитологическом скрининге. Goyal et al. сообщили, что первоначальными цитологическими диагнозами четырех шеечных мазков от двух пациенток со SMILE были отсутствие атипичных клеток, ASCUS (атипичные клетки неопределенного злокачественного потенциала) (два образца), LSIL [7]. Gupta et al. сопоставили цитологический и гистологический диагнозы у трех пациенток со SMILE: у одной из них в мазке были обнаружены признаки, подозрительные в отношении железистой неоплазии, у второй – тяжелый дискариоз, у третьей – умеренный дискариоз, в последующей петлевой эксцизии выявлены структурные особенности CIN3 и SMILE, SMILE и CGIN (цервикальная железистая интраэпителиальная неоплазия), CIN2 и SMILE, соответственно [8].

Вместе с тем при повторном исследовании цитологических образцов исследователям удалось установить единые цитологические критерии SMILE. Ими стали большие трехмерные пласты клеток со «скученными» ядрами, то есть скоплениями клеток с разным расстоянием между ядрами и псевдорядными ядрами (создающими впечатление расположения ядер клеток друг над другом), увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлыми или овальными гиперхромными ядрами переменного размера с нежными ядрышками. Цитоплазматические вакуоли хотя и идентифицированы в более чем половине мазков, были едва различимы и выявлялись только после тщательного микроскопического исследования [3, 18].

Возникновение SMILE связывают с существованием мультипотентных стволовых клеток, расположенных в переходной зоне/зоне трансформации шейки матки. Так, Herfs et al. доложили о популяции однорядных кубических эпителиальных клеток переходной зоны шейки матки, вероятно являющихся родоначальными для всех цервикальных карцином, ассоциированных с ВПЧ. Авторы установили, что эти клетки переходной зоны обладают единым генным профилем, отличающимся от профиля клеток прилежащего эндоцервикального, эктоцервикального и метапластического эпителия. Клетки переходной зоны регистрируются во всех HSIL и плоскоклеточных карциномах, указывая на общее происхождение. Их отсутствие в большинстве LSIL независимо от типа ВПЧ свидетельствует о развитии LSIL в клетках многослойного плоского или метапластического эпителия и вследствие этого обладающего низким риском прогрессирования в плоскоклеточную карциному. Кроме того, обнаружение клеток переходной зоны в отдельных LSIL в сочетании с диффузной экспрессией p16INK4a, свойственной HSIL, позволяет выявить высокий онкогенный потенциал данного ин-

траэпителиального поражения и провести необходимые лечебные мероприятия [9].

Martens et al. при изучении аутопсийного материала 13 плодов 16–40 недель гестации идентифицировали резервные клетки на 20-й неделе беременности под мюллеровым эпителием, выстилающим развивающуюся полость матки. Последние имели схожий иммунопрофиль не только с клетками мюллера эпителия, но и с резервными и эндоцервикальными клетками взрослых женщин. В связи с этим авторы сделали заключение, что, во-первых, клетки мюллера эпителия являются стволовыми и для резервных клеток шейки матки, и для эндоцервикальных клеток, а во-вторых, они обладают способностью к дифференцировке на ранних этапах канцерогенеза как в эндоцервикальный, так и в плоский эпителий [13].

Smedts et al. на основании проведенного иммуногистохимического исследования подразделили AIS на два фенотипически разных типа: аденокарциномы, возникающие из резервных клеток, и аденокарциномы, происходящие из эндоцервикального эпителия. Выполненная работа подтверждает способность резервных клеток к злокачественной трансформации в CIN, AIS и их сочетания, вместе с тем однонаправленная трансформация клеток-предшественников железистого компонента шейки матки приводит к развитию исключительно эндоцервикальной аденокарциномы [20].

Ранее сообщалось, что на структурные особенности, классификацию и интерпретацию поражений шейки матки одновременно оказывают влияние не только тип ВПЧ, но и дифференцировка и степень зрелости инфицированной клетки. Например, инфицирование одним и тем же типом ВПЧ при различной локализации поражения приводит к развитию карцином с разным потенциалом злокачественности (менее дифференцированных – при распространении патологического процесса или его изначальном развитии в цервикальном канале). ВПЧ типа 6 и 11 традиционно способствуют развитию остроконечной кондиломы шейки матки (LSIL). В то же время незрелые папиллярные поражения, обозначаемые как папиллярная незрелая метаплазия, папиллома и незрелая (пограничная) кондилома, также ассоциированные с ВПЧ типа 6 и 11, отличаются резким снижением степени зрелости клеток с легкой атипией ядер, вероятно, возникают при инфицировании ВПЧ незрелого метапластического эпителия и представляют незрелую форму LSIL. По-видимому, подобное наблюдается и в HSIL. Так, HSIL, имеющие сходство с метапластическим эпителием, возможно, являются более агрессивным аналогом незрелой кондиломы [2, 6, 15]. Таким образом, инфицирование ВПЧ мультипотентной стволовой/резервной клетки приводит к возникновению у пациентки одновременно CIN и AIS или развитию интраэпителиального поражения с плоскоклеточной и эндоцервикальной дифференцировкой, которое и представляет SMILE [5, 16].

Таким образом, SMILE представляют собой редкое интраэпителиальное поражение шейки матки с многослойным строением и наличием муцина в цитоплазме клеток, возникающее из мультипотентной стволовой/резервной клетки зоны трансформации шейки матки при ее инфицировании ВПЧ, нередко сопровождающееся CIN, AIS, плоскоклеточной карциномой и эндцервикальной аденокарциномой и способное прогрессировать в инвазивный рак.

## Литература

1. Коган Е.А., Файзуллина Н.М., Цзяцзин Л., Демура Т.А., Козаченко А.В. Эффективность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с использованием комплекса методов: жидкостной цитологии, двойного иммуноокрашивания p16/Ki67 и ВПЧ тестирования // *Акушерство и гинекология*. 2014. № 7. С. 43–47. [Kogan E.A., Faizullina N.M., Czyaczin L., Demura T.A., Kozachenko A.V. Efficiency of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis using a set of methods: liquid-based cytology, p16/Ki-67 dual immunostaining and HPV testing // *Akusherstvo i gynecologiya*. 2014. V. 7. P. 43–47. (In Russ)].
2. Хрянин А.А., Решетников О.В. Папилломовирусная инфекция: современный взгляд на эпидемиологию, профилактику и лечение // *Гинекология*. 2013. Т. 5, № 15. С. 16–20. [Chryanin A.A., Reshetnikov O.V. Pappilomaviral infection, modern approach: epidemiology, prophylaxis and treatment // *Gynecologiya*. 2013. V. 5, No 15. P. 16–20. (In Russ)].
3. Backhouse A., Stewart C.J.R., Koay M.H.E., Hunter A. et al. Cytologic findings in stratified mucin-producing intraepithelial lesion of the cervix: a report of 34 cases // *Diagn. Cytopathol*. 2016;44:20–5.
4. Boyle D.P., McCluggage W.G. Stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE): report of a case series with associated pathological findings // *Histopathology*. 2015;66:658–63.
5. Crum C.P. Contemporary Theories of Cervical Carcinogenesis: The Virus, the Host, and the Stem Cell // *Mod Pathol*. 2000;13(3):243–51.
6. Geng L., Connolly D.C., Isacson C., Ronnett B.M. et al. Atypical immature metaplasia (AIM) of the cervix: is it related to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)? // *Hum Pathol*. 1999;30:345–51.
7. Goyal A., Yang B. Cytologic features of stratified mucin producing intraepithelial lesion of the cervix – A case report // *Diagn Cytopathol*. 2014;42:792–7.
8. Gupta S., Parsons P., Saha A., Wight C. Follow-up of patients with SMILE (stratified mucin producing intraepithelial lesion) on the cervix – A dilemma // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;148:207–9.
9. Herfs M., Yamamoto Y., Laury A., Wange X. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:10516–21.
10. Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. (eds.). World Health Organization classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC Press, 2014.
11. Lastra R.R., Park K.J., Schoolmeester J.K. Invasive stratified mucin-producing carcinoma and stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE): 15 cases presenting a spectrum of cervical neoplasia with description of a distinctive variant of invasive adenocarcinoma // *Am J Surg Pathol*. 2016;40:262–9.
12. Li C., Rock K.L., Woda B.A., Jiang Z. et al. IMP3 is a novel biomarker for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: an immunohistochemical study in comparison with p16 (INK4a) expression // *Mod. Pathol*. 2007;20:242–7.
13. Martens J.E., Smedts F., van Muyden R.C., Schoots C. et al. Reserve cells in human uterine cervical epithelium are derived from mullerian epithelium at midgestational age // *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26:463–8.
14. Onishi J., Sato Y., Sawaguchi A., Yamashita A. et al. Stratified mucin-producing intraepithelial lesion with invasive carcinoma: 12 cases with immunohistochemical and ultrastructural findings // *Human Pathology*. 2016;55:174–81.
15. Park J.J., Genest D.R., Sun D., Crum C.P. Atypical immature squamous proliferations of the cervix: reproducibility and viral (HPV) correlates // *Hum Pathol*. 1999;30:1161–5.
16. Park J.J., Sun D., Quade B.J., Flynn C. et al. Stratified mucin-producing intra-epithelial lesions of the cervix: adenosquamous or columnar cell neoplasia // *Am. J Surg Pathol*. 2000;24:1414–9.
17. Resnick M., Lester S., Tate J.E., Sheets E.E. et al. Viral and histopathologic correlates of MN and MIB-1 expression in cervical intraepithelial neoplasia // *Hum Pathol*. 1996;27:234–9.
18. Schwock J., Rouzbahman M., Geddie W.R. Stratified mucin-producing intraepithelial lesion of the cervix: A diagnostic challenge // *Cytojournal*. 2014;11:22.
19. Smedts F., Ramaekers F., Troyanovsky S., Pruszczynski M. et al. Basalcell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia // *Am J Pathol*. 1992;140:601–12.
20. Smedts F., Ramaekers F.C., Hopman A.H. The two faces of cervical adenocarcinoma in situ // *Int J Gynecol Pathol*. 2010;29:378–85.
21. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M. et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development // *Nature*. 1999;398:714–8.

## STRATIFIED MUCIN-PRODUCING INTRAEPITHELIAL LESION OF THE UTERINE CERVIX

M.V. Shamarakova, A.V. Asaturova, L.S. Ezhova, A.V. Kozachenko

The purpose of the study was to perform systematic analysis of the available data on premalignant stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE) of the uterine cervix. The review includes data from foreign and domestic articles published over the past 20 years and indexed in PubMed.

SMILE is a cervical intraepithelial lesion featured by stratified atypical epithelial cells displaying varying quantities of intracytoplasmic mucin throughout the majority of the lesional epithelium. SMILE is p16-pos-

itive and exhibits a high Ki-67 proliferation index, staining negative for keratin-14 and p63 and variably for p16INK4a. Observations of invasive carcinoma are described with morphologic features identical to SMILE, in some patients with metastatic lesions of the abdominal cavity and lungs. Cytologic changes included the presence of three dimensional cell clusters with nuclear crowding, increased nuclear:cytoplasmic ratios and mild cytologic atypia. SMILE believed to arise from high-risk human papillomavirus (HPV)-infected stem or reserve cells with the potential for multidirectional differentiation.

*Conclusion.* SMILE is an uncommon variant of endocervical columnar cell preneoplasia associated with HPV-infection. It is capable of progressing to invasive carcinoma.

*Key words:* cervical intraepithelial neoplasia (CIN), squamous intraepithelial lesion (SIL), adenocarcinoma in situ (AIS), stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE)

### **Информация об авторах**

Шамараква Марина Викторовна – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон 8 (495) 438 2311. E-mail: mshamarakova@yandex.ru

Асатурова Александра Вячеславовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон 8 (495) 438 2311. E-mail: a\_asaturova@oparina4.ru

Ежова Лариса Сергеевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон 8 (495) 438 2311. E-mail: l\_ezhova@oparina4.ru

Козаченко Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения гинекологии НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова.

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон 8 (495) 438 7783. E-mail: a\_kozachenko@oparina4.ru

*Материал поступил в редакцию 22 февраля 2017 года*

# ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, НАПРАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «КЛИНИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ»

(составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации и Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы, разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

При рассмотрении полученных авторских материалов редакция руководствуется принципами Декларации, разработанной Ассоциацией научных редакторов и издателей (АНРИ) в качестве свода этических принципов, регулирующих политику редакций, редакторов, рецензентов, издателей и авторов в сфере научных публикаций (Москва, 20 мая 2016 года).

## Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, заверенным печатью. На последней странице должны быть подписи всех авторов.

Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала с полями 2,5 см с каждой стороны.

Рукописи, а также сопроводительные документы могут быть поданы в редакцию одним из следующих способов:

- по электронной почте на адрес журнала **sem.journal@mail.ru** (текст статьи подается в формате Microsoft Word, сопроводительные документы с оригинальными подписями прикрепляются к письму в формате PDF);
- обычной почтой (2 экземпляра распечатки рукописи с обязательным приложением электронной версии (в формате Microsoft Word) на CD диске, а также оригиналы всех необходимых сопроводительных документов).

Статья регистрируется в редакции только при наличии полного комплекта документов. После закрытого рецензирования статья рассматривается на заседании редакционной коллегии и может быть принята к печати, отклонена или отправлена на доработку.

При необходимости доработки статьи замечания рецензентов доводятся до сведения авторов. Авторы

исправляют статью в соответствии с замечаниями рецензента и присылают в редакцию ее новый вариант и письмо с ответом на замечания рецензента и просьбой рассмотреть статью повторно.

## Структура рукописи

**Титульный лист** должен содержать следующие элементы: УДК, название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждения (учреждений) с ведомственной принадлежностью, город.

**Формат заглавия:** название работы – прописными буквами; инициалы, фамилия авторов – курсивом, полное название организации, город – обычным шрифтом строчными буквами.

Если авторы публикации работают в разных организациях, принадлежность авторов к разным учреждениям отмечается цифрами, **как указано в образце**, – после фамилий авторов следует надстрочно указать номер, соответствующий номер ставят надстрочно перед названием организации.

### **Авторский реферат (резюме)**

Перед началом текста статьи печатаются краткий реферат (резюме) объемом **230–250 знаков**, в котором отражается основное содержание работы, и ключевые слова (**от 3 до 7**). Резюме должно излагать основные и существенные факты работы. Для оригинальных исследований резюме должно быть структурированным в соответствии с текстом статьи и включать введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). Сокращения и условные обозначения, кроме общепотребительных, применяют в исключительных случаях, им дают расшифровку и определения при первом упоминании в резюме.

Далее следует перевод на английский язык названия статьи, фамилий авторов, реферата (резюме), ключевых слов.

## Образец титульной страницы

УДК:

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛНОТЫ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ  
ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ НА СПИНЕ И ЖИВОТЕ КРЫС

Е.Ю. Кананыхина<sup>1,2</sup>, Г.Б. Большакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

## Текст резюме

*Ключевые слова:* полнослойная кожная рана, экспериментальная модель, живот, спина, рубцевание, регенерация

### QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EXTENT OF REGENERATION IN THE HEALING OF DORSAL AND VENTRAL RAT SKIN WOUNDS

*E. Yu. Kananykhina, G.B. Bolshakova*

#### Abstract text

*Key words:* full-thickness skin wound, experimental model, abdomen, back, scarring, regeneration

**Текст.** Объем оригинальной статьи не должен превышать 12 страниц (включая иллюстрации, таблицы и список литературы), кратких сообщений и описаний наблюдений – 3–4 страниц, обзорных и дискуссионных статей – 12–18 страниц. Большой объем статей с оригинальными исследованиями допускается в индивидуальном порядке, по решению редколлегии. Число рисунков и таблиц должно соответствовать объему представляемой информации. Данные, представленные в таблицах, не должны дублировать данные рисунков.

В тексте оригинальной статьи **обязательно** должны быть выделены следующие разделы: **Цель исследования; Материалы и методы; Результаты; Обсуждение** (возможно объединение разделов – **Результаты и обсуждение**); **Выводы** (или **Заключение**); **Литература**. Рубрика Введение не именуется.

При представлении в печать экспериментальных работ с использованием животных авторы должны указать, выполнялись ли требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. В разделе **Материалы и методы** кроме вида, пола и числа использованных животных авторы обязательно должны указать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы выведения животных из эксперимента. При отсутствии этих данных работы приниматься не будут.

В разделе **Материалы и методы** должны быть указаны методы статистической обработки экспериментальных и клинических данных. В тексте статьи и в таблицах при указании достоверности желательно приводить полное значение  $p$  ( $p=...$ , а не  $p<...$ ). Коэффициенты корреляции следует приводить только с указанием их статистической значимости, то есть со значением  $p$ , например  $r=0,435$ ;  $p=0,006$ .

Кроме общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК) допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте (не более 4–5 аббревиатур). Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте (но не в резюме) при их первом упоминании. Сокращения простых слов, даже если они часто повторяются, не допускаются. Единицы измерения даются по системе СИ. Курсивом указывают названия микроорганизмов, генотипов и аллелей генов.

Использование сокращений в выводах или заключении не допускается.

**Иллюстрации.** Рисунки должны быть четкими, фотографии – контрастными. На каждый рисунок необходимо сделать ссылку в статье. Подрисовочные подписи даются отдельно с указанием номера рисунка и объяснением условных обозначений. В подписях к микрофотографиям нужно указывать степень увеличения. В тексте статьи, в левом поле, желательно выделить место, где следует разместить рисунок. Внутри квадрата обозначается номер рисунка.

Каждый рисунок следует представлять отдельным файлом в формате TIF, JPEG с разрешением не менее 300 dpi (допускается формат Word). Диаграммы – в Excel или Word с сохранением данных.

**Таблицы.** Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер, заголовки – точно соответствовать содержанию граф. На каждую таблицу необходимо сделать ссылку в статье. Все разъяснения, включая расшифровку аббревиатур, даются в сносках. Следует указывать статистические методы, использованные для представления вариабельности данных и достоверности различий.

К тексту статьи должна прилагаться информация об авторах – фамилия, имя, отчество полностью, ученая степень, звание, должность и место работы (обязательно с почтовым адресом, включая индекс) каждого автора, фамилия, имя, отчество, e-mail и мобильный телефон автора, ответственного за связь с редакцией.

Статья должна быть выверена автором и отредактирована. При обнаружении большого количества стилистических ошибок и опечаток статья будет возвращена.

#### Библиография и образцы оформления литературы

Библиографический список: предпочтительно статьи в журналах за последние 5 лет, за исключением основополагающих работ. Не рекомендуется включать в список диссертационные работы и авторефераты, ссылки на русскоязычные тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций.

В оригинальных статьях цитируется не более 15–20 источников, в обзорах – не более 50. Ссылки на публикации авторов статьи (самоцитирование) не должны составлять более 15 процентов от общего списка. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных. Библиографические источники (сначала отечественные, затем иностранные) должны быть расположены в алфавитном порядке и пронумерованы. В тексте статьи библиографические ссылки

даются в квадратных скобках арабскими цифрами в соответствии со списком литературы. Список литературы должен быть озаглавлен **Литература/References**, напечатан на отдельном листе через 1,5 интервала, каждый источник с новой строки под порядковым номером; при отсутствии полных выходных данных статьи указывается DOI. За правильность приведенных в литературном списке данных ответственность несет автор. Фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции.

Названия отечественных журналов даются полностью, зарубежных – в сокращенном в соответствии со стилем, принятым в PubMed.

В отечественных публикациях приводятся фамилии и инициалы всех авторов, в зарубежных источниках авторы книги или статьи (при авторском коллективе до 4 человек включительно) упоминаются все, при больших авторских коллективах — 4 первых автора и «et al.».

### Изменение прежних правил

С учетом требований международных систем цитирования (Web of Science, Scopus) после каждого русскоязычного источника в квадратных скобках помещается его библиографическая ссылка, имеющая следующую структуру: авторы и название книги или статьи (английский язык), название источника (транслитерация в стандарте BSI), выходные данные в цифровом формате. В конце англоязычной части библиографического описания в круглых скобках указывается язык публикации (In Russ.).

### Образцы оформления литературы

#### Статья в журнале

*Прощина А.Е.* Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. № 2. С. 4–11 [*Proshchina A.E.* Plasticity of the endocrine part of human pancreas // *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya*. 2017. V. 2. P. 4–11. (In Russ.)].

*Виноходова А.Г., Быстрицкая А.Ф., Смирнова Т.М.* Способность к психической саморегуляции как фактор устойчивости к стрессу в экстремальных условиях космического полета // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2005. Т. 39, № 5. С. 14–18. [*Vinokhodova A.G., Bystritskaya A.F., Smirnova T.M.* Ability to control own psyche as a factor of stress tolerance in the extreme conditions of space flight // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2005. V. 39. N. 5. P. 14–18. (In Russ.)].

*Price S., Anning P.B., Mitchell J.A., Evans T.W.* Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications // *Eur Heart J*. 1999; 20(10):715–24.

*Beirne J.P., McArt D.G., James J.A., Salto-Tellez M. et al.* p16 as a prognostic indicator in ovarian/tubal high-

grade serous carcinoma // *Histopathology*. 2016;68(4): 615–8.

*Mundinger T.O., Mei Q., Foulis A.K., Fligner C.L. et al.* {PT ArticleTitle} Human type 1 diabetes is characterized by an early, marked, sustained and islet-selective loss of sympathetic nerves // {/ArticleTiDiabetes}{/JournalTitle PT}, {PT Year}2016{/Year PT}; doi: {PT DOI}10.2337/db16-0284.

#### Книга

*Хмельницкий О.К.* Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: Руководство. СПб.: Сотис, 2002. 288 с. [*Khmelnitsky O.K.* Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases: A guide. SPb.: Sotis, 2002. 288 s. (In Russ.)].

*Воробьев А.П.* (ред.). Руководство по гематологии. 3-е изд. Т. 3. М.: Ньюдиамед, 2005. 416 с. [*Vorobyov A.P., ed.* Manual on hematology. 3rd ed. V. 3. Moscow: Nyudiamed, 2005. 416 s. (In Russ.)].

*Радзинский В.Е.* (ред.). Перионеология: Учебное пособие. М.: РУДН, 2008. 78 с. [*Radzinsky V.E., ed.* Perionology: Textbook. Moscow: RUDN, 2008. 78 p. (In Russ.)].

*An Y.H., Kylie L.M.* Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 315 p.

#### Глава в книге, статья в сборнике

*Иванова А.Е.* Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: Демографическое развитие России в XXI веке / Под ред. В.Г. Осипова, Л.Л. Рыбаковского. М.: Экон-Информ, 2009. С. 110–131. [*Ivanova A.E.* Trends and causes of death of the population of Russia / *Demograficheskoye razvitiye Rossii v XXI veke*. М.: Ekon-Inform. 2009. S. 110–131. (In Russ.)].

*Peter H.J., Geber H., Studer H., Grosch P. et al.* Thyroid cell lines forming follicle-like lumina in vitro. In: A. Gordon (ed.) *Progress in Thyroid Research*. Rotterdam: Balkema, 1991. P. 579–82.

*Chhabra P., Kensinger C.D., Moore D.J., Brayman K.L.* Present Accomplishments and Future Prospects of Cell-Based Therapies for Type 1 Diabetes Mellitus. In: *Type 1 Diabetes – Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy* / Ed. by D. Wagner. Shanghai: InTech, 2011. P. 295–335.

*Silver R.M., Peltier M.R., Branch D.W.* The immunology of pregnancy. In: Creasey R.K., Rcsnik R., eds. *Maternal-fetal medicine: Principles and practices*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. P. 89–109.

#### Редакторы, составители в качестве авторов

*Крыжановский Г.Н.* Пластичность. В кн.: Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. М.: Медицина, 2002. 632 с. [*Kryzhanovsky G.N.* Plasticity. In: *Disregulation pathology: A guide for physicians and biologists* / edited by G.N. Kryzhanovsky / *Dizregulyatsionnaya patologiya*:

Rukovodstvo dlya vrachev i biologov. Moscow: Meditsina, 2002. 632 s. (In Russ.).

Mikhelson A.D., ed. Platelets. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007. 1398 p.

Mesiecky J., Lamm M.E., Strober W., eds. Mucosal immunology. 3rd ed. New York: Academic Press, 2005. 2064 p.

### **Материалы научных конференций**

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода: Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». М., 2000. С. 516–519. [Salov I.A., Marinushkin D.N. Obstetrical tactics in fetal death: Materials of the IV Russian forum «Mother and child» / Materialy IV Rossiyskogo foruma «Mat i ditya». М., 2000. S. 516–519. (In Russ.).]

Берченко Г.Н. Костные трансплантаты в травматологии и ортопедии. В сб.: Применение искусственного имплантата Коллапан в травматологии и ортопедии. М., 2008. С. 3–8. [Berchenko G.N. Bone grafts in trauma and Orthopaedics / V sb.: Primeneniye iskusstvennogo implantata Kollapan v travmatologii i ortopedii. М., 2008. P. 3–8. (In Russ.).]

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., eds. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World congress on medical informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. P. 1561–5.

### **Диссертации**

Мусина Л.М. Анатомическое обоснование восстановления альвеолярного отростка верхней челюсти со-

единительнотканными аллотрансплантатами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2014. 23 с. [Musina L.M. Anatomical study on the rehabilitation of the alveolar process of the maxilla by connective tissue allografts: Diss., Ufa, 2014. (In Russ.).]

### **Множественные публикации**

Редакция не рассматривает статьи ранее опубликованные, одновременно представленные для публикации в другие журналы, а также работы, которые в большей части уже были опубликованы в виде статьи или представлены для публикации (приняты к печати) другим печатным изданием либо электронными средствами массовой информации. Это не исключает рассмотрение статьи, не принятой к публикации другим журналом, или полного описания, представленного после публикации предварительных результатов, то есть тезисов или постерных сообщений, представленных на профессиональных конференциях.

\* \* \*

Статьи, оформление которых не соответствует настоящим требованиям, рассматриваться не будут. Присланные рукописи, которым отказано в публикации, не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на сокращение и редактирование присланных статей.

**Авторские экземпляры** не предусмотрены. Журнал «Клиническая и экспериментальная морфология» можно получить только по подписке.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»**

**Консультативно-диагностический центр**



Консультативно-диагностический центр на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» образован в 2005 году. КДЦ осуществляет клинико-лабораторные исследования, согласно действующей лицензии.\*

Центр оснащен высокотехнологичным, отвечающим современным требованиям оборудованием и укомплектован высококвалифицированными врачами – патологоанатомами и врачами лабораторной диагностики.



Консультативно-диагностический центр предлагает следующие услуги.

1. Патоморфологическое исследование биопсийного и операционного материала.
2. Патоморфологическое исследования материала ветеринарных клиник.
3. Патоморфологическое исследование экспериментального материала.
4. Консультирование сложных диагностических биопсий и аутопсийных наблюдений.
5. Фотодокументирование результатов исследований.
6. Оценка эффективности действия лекарственных средств на моделях заболеваний человека: системный воспалительный ответ, хронический неспецифический язвенный колит, опухоли мозга, хронический простатит, невынашивание беременности и т.д.

Консультативно-диагностический центр на договорной основе выполняет научно-исследовательские работы и оказывает консультативные услуги научным и производственным организациям.



Нашим приоритетом является высококачественное гистологическое исследование клинического и экспериментального материала. Высокое качество научных исследований определяется профессионализмом сотрудников, применением современного оборудования и методов исследования – гистологических, морфометрических, гистохимических, иммуногистохимических, электронномикроскопических, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, культуральных, иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии.

**Контакты:**

Адрес: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3  
Тел./факс 8 (499) 120-94-79  
<http://www.morfolhum.ru>