

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 14 | № 3 | 2025

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

«Клиническая
и экспериментальная
морфология»

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность: 6 раз в год

Основан в 2011 году

Журнал индексируется в:

Scopus;

RSCI;

РИНЦ;

представлен в информационной
базе данных eLIBRARY.ru

Включен в перечень ВАК

Учредитель

ФГБНУ «РНЦХ

им. акад. Б.В. Петровского»

119435, Москва,

Абрикосовский пер., д. 2

Адрес редакции

117418, Москва,

ул. Цюрупы, д. 3

Заведующая редакцией

Куликова К.А.

Научный редактор

Грушецкая Е.О.

Телефоны +7 (499) 120-13-34

+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

www.mdv-group.ru

Подписные индексы:

70045 по каталогу
агентства «Урал-Пресс»

70045 по каталогу «Пресса
России» через агентство АРЗИ

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

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

Главный редактор

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

Почетный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

Процина А.Е., доктор биол. наук, доцент, Москва, Россия

Редакционная коллегия

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

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

Арешидзе Д.А., кандидат биол. наук,
Москва, Россия

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

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

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

Ельчанинов А.В., доктор мед. наук,
доцент, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

Авагимян А.А., кандидат мед. наук,
Ереван, Армения

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 14 | No 3 | 2025

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

“Clinical
and experimental
morphology”

SCIENTIFIC AND PRACTICAL
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 6 issues per year

Founded in 2011

The journal is indexed in
Scopus;
Russian Science Citation Index
(RSCI);
online platform of the Russian
Science Citation Index database
eLIBRARY.ru

The Journal is included
in the current List of Scientific
Journals of the Higher Attestation
Commission of Russia
(Vysshaya Attestatsionnaya
Komissiya, VAK)

Journal founder

FSBSI “Petrovsky National
Research Centre of Surgery”
Abrikosovskiy lane, 2,
Moscow, 119435, Russia

Editorial office address

Tsyurupy st., 3,
Moscow, 117418, Russia

Managing editor Kulikova K.A.
Science editor Grushetskaya E.O.

Tel. +7 (499) 120-13-34

+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

Edition of 500 copies

Publisher
“Gruppa MDV”
www.mdv-group.ru

Subscription index:

7045 according
to the “Ural-Press” agency catalog

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

The mass media registration
certificate III № ФС77-83521
dated June 24, 2022

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

Editor-in-Chief

Mikhaleva, Lyudmila M., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

Honorary Editor-in-Chief

Kakturskiy, Lev V., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Zairatyants, Oleg V., Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

Executive Secretary

Proshchina, Alexandra E., Dr. Sci. Biol., Associate Professor, Moscow, Russia

Editorial Board

Aleksandrova, Maria A., Dr. Sci. Biol.,
Moscow, Russia

Andreeva, Elena R., Dr. Sci. Biol., Associate
Professor, Moscow, Russia

Areshidze, David A., Cand. Sci. Biol.,
Moscow, Russia

Banin, Victor V., Corresponding
Member of the Russian Academy
of Sciences, Dr. Sci. Med., Professor, Moscow,
Russia

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

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

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

Elchaninov, Andrey V., Dr. Sci. Med.,
Associate Professor, Moscow, Russia

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

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

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

Makarova, Olga V., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

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

Nikityuk, Dmitriy B., Academician of the
Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Nikolenko, Vladimir N., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Nizyaeva, Natalia V., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Paukov, Vyacheslav S., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Postnov, Anton Yu., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Ryzhova, Marina V., Dr. Sci. Med.,
Moscow, Russia

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

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

Advisory Board

Avagimyan, Ashot A., Cand. Sci. Med.,
Yerevan, Armenia

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

Ermolaeva, Svetlana A., Dr. Sci. Med.,
Moscow, Russia

Erofeeva, Lyudmila M., Dr. Sci. Biol.,
Professor, Moscow, Russia

Fatkhudinov, Timur Kh., Dr. Sci. Med.,
Associate Professor, Moscow,
Russia

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

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

Kononov, Alexey V., Dr. Sci. Med., Professor,
Omsk, Russia

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

Kravtsov, Vladimir G., Cand. Sci. Med.,
Tel Aviv, Israel

Milovanov, Andrey P., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Mishnev, Oleko D., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ
REVIEWS

- | | | |
|---|---|---|
| <p><i>В.В. Литвинов, Г.Г. Фрейнд, М.В. Степанова</i>
Роль D-аминокислот в развитии нейродегенерации при болезни Альцгеймера</p> | 5 | <p><i>V.V. Litvinov, G.G. Freynd, M.V. Stepanova</i>
The role of D-amino acids in neurodegeneration associated with Alzheimer's disease</p> |
|---|---|---|

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH

- | | | |
|--|----|---|
| <p><i>Л.М. Михалева, А.А. Камалов, В.К. Карпов, Н.К. Шахпазян, О.А. Османов, В.В. Печникова</i>
Особенности воспалительной реакции в предстательной железе при ее доброкачественной гиперплазии и раке в зависимости от наличия вирусной инфекции</p> | 15 | <p><i>L.M. Mikhaleva, A.A. Kamalov, V.K. Karpov, N.K. Shakhpazyan, O.A. Osmanov, V.V. Pechnikova</i>
Features of inflammatory response in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer depending on the presence of viral infection</p> |
| <p><i>Х.М. Ахриева, А.Б. Казумова, Н.В. Пачуашвили, Е.А. Коган, А.С. Тertychnyy</i>
Анализ применения современных гистологических критериев диагностики болезни Крона и язвенного колита на биопсийном материале</p> | 25 | <p><i>Kh.M. Akhrieva, A.B. Kazumova, N.V. Pachuashvili, E.A. Kogan, A.S. Tertychnyy</i>
Analysis of implementing modern histological criteria for diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis using biopsies</p> |
| <p><i>А.К. Конюкова, Л.М. Михалева, С.Г. Шаповальянц, А.И. Михалев, К.В. Болихов, А.В. Шулаев</i>
Сравнительная характеристика иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки при дивертикулярной болезни</p> | 33 | <p><i>A.K. Konyukova, L.M. Mikhaleva, S.G. Shapovalyants, A.I. Mikhalev, K.V. Bolikhov, A.V. Shulaev</i>
Comparative analysis of the immune landscape of the colon mucosa in diverticular disease</p> |
| <p><i>Ю.О. Тигай, А.А. Ивина, И.И. Бабиченко, О.Ф. Рабинович, И.М. Рабинович, Д.Р. Фамилья Фриас</i>
Изучение продукции белков Ki67 и p53 при развитии веррукозной карциномы</p> | 42 | <p><i>Yu.O. Tigay, A.A. Ivina, I.I. Babichenko, O.F. Rabinovich, I.M. Rabinovich, D.R. Familia Frias</i>
Ki-67 and p53 protein production in the development of verrucous carcinoma</p> |
| <p><i>Г.М. Казанская, А.М. Волков, Р.С. Киселев, Д.В. Костромская, С.Д. Аладьев, Е.Э. Кливер, С.В. Айдагулова, Э.В. Григорьева, А.В. Строкотова</i>
Гетерогенность содержания глюкокортикоидного рецептора в глиомах высокой степени злокачественности</p> | 49 | <p><i>G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov, R.S. Kiselev, D.V. Kostromskaya, S.D. Aladev, E.E. Kliver, S.V. Aidagulova, E.V. Grigorieva, A.V. Strokovova</i>
Heterogeneity of glucocorticoid receptor content in high-grade gliomas</p> |

*Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, А.К. Павлова,
А.В. Егорова, Е.Н. Федорова, М.С. Рябова,
В.С. Сухоруков*
Множественные эффекты ингибитора деления
митохондрий mdivi-1 на гранулярные нейроны
зубчатой извилины гиппокампа крыс

58

*D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, A.K. Pavlova,
A.V. Egorova, E.N. Fedorova, M.S. Ryabova,
V.S. Sukhorukov*
Multiple effects of mitochondrial division inhibitor
mdivi-1 on granular neurons of the dentate gyrus
in rats

МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

*В.С. Щекин, Ю. Ванг, А.И. Лебедева,
С.А. Муслимов, И.И. Терезулов, А.О. Власова,
Р.Р. Загитов, А.В. Самородов*
Сравнение гистохимических методов
Ли и Маллори для выявления ишемических
повреждений миокарда

72

*V.S. Shchekin, Y. Wang, A.I. Lebedeva,
S.A. Muslimov, I.I. Teregulov, A.O. Vlasova,
R.R. Zagitov, A.V. Samorodov*
Comparative analysis of Lie and Mallory methods
for detecting myocardial ischemic injury

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

*Д.Ф. Галбацов, М.Б. Борисенко, Н.Н. Соловьев,
А.М. Емелин, Р.В. Деев*
Секционное наблюдение спорадической болезни
Крейтцфельда–Якоба

80

*D.F. Galbatsov, M.B. Borisenko, N.N. Soloviev,
A.M. Emelin, R.V. Deev*
Autopsy observations of sporadic Creutzfeldt-Jakob
disease

ХРОНИКА EVENTS

Мемориальная конференция,
посвященная 100-летию со дня рождения
академика Н.К. Пермякова

86

Memorial conference on 100th birth anniversary
of Academician Nikolay Permyakov

Роль D-аминокислот в развитии нейродегенерации при болезни Альцгеймера

В.В. Литвинов^{1,2}, Г.Г. Фрейнд¹, М.В. Степанова¹

¹ ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

² ФГАОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Резюме. Ассоциированная со старением болезнь Альцгеймера – наиболее часто встречающееся нейродегенеративное заболевание, морфологическим субстратом которого являются отложения бета-амилоида и тау-белка в головном мозге. D-аминокислоты, представленные в центральной нервной системе в основном D-серином, играют ключевую роль в модуляции синаптической передачи. В норме D-серин, синтезируемый в нейронах и клетках глии, облегчает глутаматергическую передачу, обеспечивая трофический эффект в нейронных сетях. Процесс старения сопровождается снижением синтеза D-серина с уменьшением активности NMDA-рецепторов, редукцией величины долговременной потенциации в гиппокампе и ослаблением нейронной пластичности. Комплекс патогенетических изменений при болезни Альцгеймера, представленный в своей основе сенесценцией микроглии и нейровоспалением, способствует синтезу дополнительного количества D-серина, который вызывает эксайтотоксичность, избыточно стимулирует NMDA-рецепторы, и процессы нейродегенерации, обуславливающие развитие деменции. Изложены данные о связи глиальной дисфункции, эксайтотоксичности и нейродегенерации с метаболизмом D-аминокислот. Обсуждается возможность определения D-аминокислот для диагностики болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: D-серин, D-аминокислоты, NMDA-рецепторы, сенесценция микроглии, нейровоспаление, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера

Для корреспонденции: Валерий Викторович Литвинов. E-mail: drlitvinov@mail.ru

Для цитирования: Литвинов В.В., Фрейнд Г.Г., Степанова М.В. Роль D-аминокислот в морфогенезе нейродегенерации при болезни Альцгеймера. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):5–14. DOI: 10.31088/СЕМ2025.14.3.5-14.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-13-00038.

Статья поступила 11.12.2024. Получена после рецензирования 31.01.2025. Принята в печать 17.02.2025.

The role of D-amino acids in neurodegeneration associated with Alzheimer's disease

V.V. Litvinov^{1,2}, G.G. Freynd¹, M.V. Stepanova¹

¹ E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

² Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Abstract. Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease, characterized by deposits of amyloid beta and tau protein in the brain. D-amino acids, primarily represented in the central nervous system by D-serine, play a key role in modulating synaptic transmission. Normally, D-serine, synthesized in neurons and glial cells, facilitates glutamatergic transmission and provides a trophic effect in neural networks. Aging is accompanied by a decrease in D-serine synthesis leading to reduced NMDA receptor activity, a decline in the magnitude of long-term potentiation in the hippocampus, and a weakening of neural plasticity. The complex pathogenetic changes in Alzheimer's disease, represented by microglial senescence and neuroinflammation, promote the synthesis of additional amounts of D-serine, which cause both excitotoxicity due to excessive stimulation of NMDA receptors, and neurodegeneration processes that trigger dementia. This paper presents data on the relationship between glial dysfunction, excitotoxicity, and neurodegeneration with D-amino acid metabolism and discusses the potential of using D-amino acids to diagnose Alzheimer's disease.

Keywords: D-serine, D-amino acids, NMDA receptors, microglial senescence, neuroinflammation, neurodegeneration, Alzheimer's disease

Corresponding author: Valeriy V. Litvinov. E-mail: drlitvinov@mail.ru

For citation: Litvinov V.V., Freynd G.G., Stepanova M.V. The role of D-amino acids in neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):5–14 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.5-14.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 23-13-00038.

Received 11.12.2024. **Received in revised form** 31.01.2025. **Accepted** 17.02.2025.

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием с прогрессирующей потерей памяти и развитием деменции. Выделяют две формы БА: с ранним началом (наследственная, или семейная, форма) и с поздним началом (спорадическая форма). В развитии наследственной формы БА ключевую роль играют мутации в генах, ответственных за метаболизм бета-амилоидов (A β), что приводит к избытку A β 40 и A β 42 с дальнейшим формированием амилоидных бляшек в ткани головного мозга. Данная форма встречается примерно в 5% всех случаев БА и практически не имеет морфологических отличий от ее спорадической формы [1, 2]. Значение генетических мутаций в происхождении спорадической формы БА не столь значимо, но существенную роль в нарушении обмена A β играют эпигенетические и метаболические процессы, связанные с развитием нейровоспаления [3]. Основной фактор риска развития спорадической формы БА – возраст: заболевание выявляется более чем у 20% лиц, достигших 85 лет. В связи с этим ожидается, что распространенность БА будет возрастать по мере увеличения продолжительности жизни населения в мире и к 2050 году достигнет 150 миллионов человек [4].

Двумя классическими морфологическими признаками БА являются внеклеточные амилоидные бляшки, представленные в основном A β 42, и внутриклеточные нейрофибрилярные клубки, состоящие из гиперфосфорилированного тау-белка. Исходя из концепции Braak, нейрофибрилярные клубки формируются в энторинальной коре височных долей, распространяясь в дальнейшем на другие отделы головного мозга, что приводит к нарушению синаптической функции с последующей нейродегенерацией и гибелью нейронов, обуславливающей развитие когнитивного дефицита. При этом амилоидные бляшки имеют иные пути распространения и меньше коррелируют с клиническими стадиями БА [1, 5].

Процессы формирования, распространения и агрегации A β в бляшки, как и процессы гиперфосфорилирования тау-белка в нейронах, активно изучаются и достаточно подробно описаны [6, 7]. Считается, что олигомеры A β деполаризируют мембрану нейронов, приводя к избыточному притоку Ca $^{2+}$ в клетку через каналы NMDA-рецепторов с последующим нарушением функций митохондрий и увеличением вы-

работки активных форм кислорода [8]. Есть основания полагать, что важную роль в развитии БА играют D-аминокислоты, которые, обеспечивая баланс передачи сигналов через NMDA-рецепторы, поддерживают нейронную пластичность и устойчивость к развитию нейровоспаления и нейродегенерации [9, 10].

В представленном обзоре проанализированы данные о ключевых D-аминокислотах и их связи с процессами сенесценции (старения) микроглии, нейровоспаления, эксайтотоксичности и нейродегенерации при БА.

Нейронная пластичность, долговременная потенцияция и NMDA-рецепторы

По современным представлениям физиологической основой когнитивной сферы является так называемая нейронная пластичность – способность нейронных цепей изменять структурно-функциональную организацию под влиянием экзогенных и эндогенных факторов. Изучение нейронной пластичности началось с описания механизма долговременной потенциации (long term potentiation, LTP) в гиппокампе. Регуляция этого механизма связана с глутаматергическими NMDA-рецепторами и заключается в повышении эффективности синаптической передачи, а нарушение LTP отражается на функциях обучения и формирования памяти [11]. Существует также механизм долговременной депрессии (long term depression, LTD), регуляция которого в большей степени осуществляется метаботропными глутаматными рецепторами I группы (mGluR1). LTD проявляется снижением эффективности синаптической передачи, а его физиологическая функция связана с формированием следов памяти [12].

Фармакологическая блокада NMDA-рецепторов резко ухудшает память и обучаемость, может привести к нарушению нейронной пластичности со снижением LTP и атрофии коры головного мозга [13]. Напротив, стимуляция NMDA-рецепторов может усилить LTP и улучшить память и обучаемость. Известно, что гиппокамп – одна из ключевых структур, ответственных за механизмы памяти, которая особенно уязвима к повреждениям. При этом нейронные цепи, наиболее подверженные процессу старения, в значительной степени состоят именно из глутаматергических нейронов [14].

NMDA-рецептор представляет собой тетрамерный ионный канал, который может состоять из множества конфигураций отдельных субъединиц, таких

как GluN1, GluN2 и реже GluN3. Для их активации требуется одновременное связывание агониста глутамата с субъединицей GluN2 и коагониста D-серина с субъединицей GluN1 [15]. Ключевыми факторами для NMDA-опосредованной нейротрансмиссии являются доступность агониста глутамата и модуляция функций рецептора. Среди модулирующих молекул D-аспартат действует как второй агонист после глутамата, связываясь с субъединицей GluN2B, а D-серин как основной эндогенный коагонист данных рецепторов [16].

Снижение величины LTP наблюдается при старении и происходит из-за низкой активности NMDA-рецепторов, что связано с деградацией биосинтеза D-серина. На основании этого было сделано предположение, что возрастассоциированное падение уровня D-серина может способствовать снижению когнитивных способностей, в том числе при нейродегенеративных заболеваниях [17].

D-серин

Эндогенный D-серин синтезируется из L-серина сериновой рацемазой – ферментом, обильно представленным в ткани головного мозга. Сериновая рацемаза требует пиридоксаль-5'-фосфата в качестве кофактора и в дополнение к рацемизации деаминирует L-серин в пируват и аммиак. Стоит отметить, что фермент уникален среди пиридоксаль-5'-фосфатзависимых ферментов из-за его потребности в двухвалентных катионах магния. Животные с нокаутом гена сериновой рацемазы демонстрируют низкую активность NMDA-рецепторов, нарушение LTP в гиппокампе и при окклюзии средней мозговой артерии более устойчивы к повреждению при инсульте, что можно связать с низкой эксайтотоксичностью [18].

Изначально считалось, что сериновая рацемаза присутствует исключительно в астроцитах, но последующие исследования позволили установить, что в основном ее содержат нейроны [11]. Позже было показано, что микроглия также содержит сериновую рацемазу и обладает способностью к синтезу D-серина [19]. Н. Wolosker et al. [20] предположили, что L-серин синтезируется в астроцитах, а затем доставляется в нейроны, где при участии сериновой рацемазы превращается в D-серин. В астроцитах L-серин может синтезироваться из глицина или из глюкозы либо поступать в клетки из внеклеточной среды. Астроциты в отличие от нейронов могут также синтезировать L-серин из промежуточного продукта гликолиза 3-фосфоглицерата [21]. О важности 3-фосфоглицератного пути для синтеза D-серина свидетельствует тот факт, что у детей с дефицитом 3-фосфоглицератдегидрогеназы отмечаются проблемы в развитии нервной системы, обусловленные более низким содержанием D-серина в ликворе [21, 22].

Катаболизм D-аминокислот осуществляется оксидазой D-аминокислот (DAAO), за исключением D-глутамата и D-аспартата, распад которых выполняет D-аспартатоксидаза. DAAO, снижая уровни D-серина,

может регулировать работу NMDA-рецепторов, однако при этом образуются свободные радикалы и развивается окислительный стресс. Наибольшее количество DAAO определяется в зонах с наименьшим уровнем D-серина – стволе головного мозга и мозжечке [23].

D-глутамат и D-аспартат

D-глутамат является самой малоизученной D-аминокислотой, что связано в первую очередь с его крайне низкой концентрацией, близкой к порогу обнаружения существующими методами. В имеющихся исследованиях по D-глутамату отмечаются его малое содержание и неоднородное распределение в нервной системе. Выяснено, что D-глутамат может накапливаться в синаптических везикулах, связываться с NMDA-рецепторами и концентрироваться в сетчатке у крыс, но его функциональная роль не определена [24]. Установлено, что уровень D-глутамата снижается с нарастанием выраженности когнитивных нарушений, но его непосредственное участие в процессах нейродегенерации требует дальнейших исследований [23].

D-аспартат связывается с глутаматным участком рецептора GluN2b, усиливая функции NMDA-рецептора, а также стимулирует метаболитные рецепторы mGlu5 [25]. Кроме того, выявлено участие D-аспартата в синтезе различных гормонов, включая мелатонин [26]. С помощью электрофизиологических исследований на животных установлено, что прием D-аспартата в течение месяца повышает LTP, зависящее от активности NMDA-рецепторов, и предотвращает снижение нейронной пластичности в гиппокампе у старых мышей [25]. У млекопитающих D-аспартат в избытке содержится в головном мозге в эмбриональном периоде, но во взрослом организме его уровни чрезвычайно низки и строго контролируются катаболизирующим ферментом D-аспартатоксидазой [26]. Длительное воздействие нефизиологически высокой концентрации (более чем в 5 раз) D-аспартата у мышей с нокаутом D-аспартатоксидазы (Ddo^{-/-}), по данным нейрофизиологических тестов, приводило к преждевременному снижению нейронной пластичности и когнитивной дисфункции за счет гиперстимуляции NMDA-рецепторов. Больше того, на этой экспериментальной модели морфологически достаточно ярко проявлялись процессы, связанные с нейровоспалением – появлением дистрофических изменений в микроглии и реактивных астроцитов [27, 28]. Было также показано, что высокие уровни D-аспартата у Ddo^{-/-} мышей индуцируют изменения в фосфорилировании тау-белка [28]. Стоит отметить, что, как и в случае с D-глутаматом, роль D-аспартата требует дальнейшего изучения.

Другие D-аминокислоты

D-аланин является малоизученной нейроэндокринной молекулой, коагонистом глицин/D-серин-связывающего сайта GluN1 субъединицы NMDA-рецептора. Исходя из накопленных данных, убедительно

тельная связь между изменением обмена D-аланина и БА пока не установлена [10, 29]. Однако имеются исследования, указывающие на роль D-аланина в цикле сон–бодрствование, нарушение которого очень характерно для БА, а эффективные подходы к его восстановлению могут оказаться одним из способов лечения заболевания [29].

По сравнению с L-аргинином, роль которого в нейродегенерации активно изучается, D-аргинин – очень малоисследованная аминокислота. Описаны ее нейропротективная функция при высоких уровнях глюкокортикоидов и участие в обмене L-аргинина, связанного с развитием нервной системы [30, 31]. При оценке содержания D-аргинина в ликворе желудочков здоровых людей и у пациентов с БА статистически значимая разница не установлена [10].

Значение таких D-аминокислот, как D-фенилаланин, D-пролин, D-аспарагин, D-цистеин, и D-аминокислот с разветвленной цепью (D-лейцин, D-валин, D-изолейцин и D-аллоизолейцин) в центральной нервной системе продолжает изучаться в связи с их достаточно низким содержанием и недостаточным количеством данных по их функциям [32]. В связи с синтезом некоторых D-аминокислот бактериями кишечной флоры (D-аланин, D-пролин, D-глутамат) и флорой полости рта (D-пролин) активно обсуждается их участие в качестве регуляторных молекул оси микробиом полости рта и кишечника–центральная нервная система [33].

Нейровоспаление, сенесценция микроглии и гипотеза глиальной дисфункции при БА

До 1995 года для описания реакции глиальных клеток на повреждение (травму) без компрометации гематоэнцефалического барьера использовалось понятие «реактивный глиоз». В дальнейшем стали появляться указания на то, что реакция глии при нейродегенеративных заболеваниях наблюдается без установленного повреждающего фактора. Молекулярно-биологические исследования глии и выделяемых ею цитокинов позволили расценивать клетки микроглии как ключевой компонент иммунной системы головного и спинного мозга, а понятие «реактивный глиоз» стало синонимом нейровоспаления. На данный момент нейровоспаление, или нейровоспалительная реакция, рассматривается как комплекс молекулярно-биологических и морфологических изменений в виде пролиферирующих клеток микроглии и астроцитов без классических признаков воспалительной реакции в ткани и оболочках мозга [34–36].

Проплиферация микроглии и активированные астроциты вблизи амилоидных бляшек первоначально оценивались как пассивная реакция на скопления Аβ, но позднее было установлено, что нейровоспалительная реакция предшествует отложению аномальных протеинов и представляет собой еще один патогномичный морфологический признак заболевания наряду с амилоидными бляшками и скоплениями тау-белка [37].

Установлено, что микроглия играет роль связующего звена между двумя протеинопатиями при БА: избыток Аβ переводит микроглию в активированное провоспалительное состояние, а активированная микроглия способствует образованию и распространению тау-белка в нейронах и за их пределами [38, 39]. Экспрессия некоторых генов, связанных с поздним началом БА, таких как *TREM2* и *CD33* (triggering receptor expressed on myeloid cells 2 и transmembrane receptor expressed on cells of myeloid lineage – гены рецепторов, связанных с врожденным иммунным ответом), а также *APOE* (apolipoprotein E – ген гликопротеина, участвующего в доставке и обмене холестерина в нейронах), происходит именно в микроглии, а прижизненные нейровизуализационные исследования показали, что прогрессирование БА определяется в большей степени реактивной микроглией, чем накоплением Аβ [2].

Воздействие раздражителей, в том числе избыток Аβ, меняет морфологию микроглии от разветвленной формы в покое (M0) к амебoidalной реактивной форме (M1) с гиперэкспрессией провоспалительных рецепторов, цитокинов и хемокинов, что обозначается как микроглиальный прайминг [34, 40]. В случае элиминации раздражителя активированные клетки микроглии переходят в противовоспалительное состояние (M2) с преобладанием фагоцитарной функции. Само по себе наличие аномальных белков в ткани головного мозга является перманентным стимулом для активации микроглии и поляризации ее в провоспалительное (M1) состояние с формированием персистирующей нейровоспалительной реакции и снижением способности к переходу в M2. В конечном счете чрезмерная активация микроглии приводит к формированию ее дистрофического, или «темного», фенотипа с низкой экспрессией Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1 – белок, экспрессия которого повышена в активированной микроглии), потерей физиологических функций и повышенной способностью к распространению тау-белка [41, 42]. Этот феномен наблюдается на поздних стадиях БА, морфологически соответствующих V–VI по Braak [3, 43]. Стоит отметить, что на данный момент подход к разделению клеток микроглии на M0, M1 и M2 считается слишком упрощенным в связи с описанием большого количества новых фенотипов микроглии, однако в рамках общей характеристики нейровоспалительной реакции он вполне применим [44].

Установлено, что M1 микроглия с помощью цитокинов переводит астроциты в активированное, проявляющееся в виде гипертрофии состояние благодаря повышению экспрессии GFAP (glial fibrillary acidic protein – основной структурный белок астроцитов) и виментина [45–47]. Описанное явление может рассматриваться как нейропротекция за счет формирования своего рода глиального рубца из гипертрофированных астроцитов, но, с другой стороны, в активированном состоянии астроциты могут усиливать воспалительную сигнализацию. Описаны механизмы того, как реактив-

ные астроциты способствуют активации микроглии. При этом А β , выделяемый нейронами, активирует NF κ B путь в астроцитах, способствуя выделению ими белка комплемента C3a. Взаимодействие данного белка с C3a рецепторами на микроглии и нейронах приводит к активации микроглии и синтезу нейронами еще большего количества А β [47].

Для поддержания состояния нейроиммунологической толерантности в центральной нервной системе описано взаимодействие мембранного гликопротеина I типа нейронов CD200 (лиганд) с его рецептором CD200R на микроглии. Сигнальная ось CD200–CD200R, модулируя порог активации воспалительной реакции, приводит к ингибированию выделения микроглией провоспалительных цитокинов и снижает ее фагоцитарную активность. Стоит отметить, что при БА экспрессия CD200 на нейронах резко снижена и ось CD200–CD200R, не оказывая модулирующего эффекта, приводит к чрезмерной активации микроглии [48].

Важно, что в процессе старения в микроглии изменяется экспрессия генов, которые отвечают за иммунный ответ и воспалительную реакцию. Порог возбудимости снижается, и незначительные воздействия, которые ранее не приводили к праймингу микроглии, запускают этот процесс. В результате стареющая микроглия производит больше активных форм кислорода, провоспалительных цитокинов и теряет способность к эффективному фагоцитозу А β , находясь преимущественно в провоспалительном состоянии M1 без перехода в M2 [49].

Старение, или сенесценция микроглии, согласуется с теорией инфламэйджинга (inflammaging). Исходя из этой концепции, с возрастом развивается постепенное прогрессирование хронического воспалительного процесса, в основе которого лежит чрезмерная стимуляция врожденной иммунной системы, где ключевую роль играют макрофаги. С возрастом в зависимости от генетических факторов и факторов окружающей среды реакция макрофагов на стрессовые воздействия может либо идти по адаптивному пути, поддерживая физиологическое старение, либо отражать нарушения адаптации, приводя к формированию болезней, ассоциированных со старением. Следует отметить, что данная теория не рассматривает воспалительную реакцию как дезадаптивный механизм, и даже избыточный воспалительный ответ, формирующийся с возрастом, может быть компенсирован достаточным ответом провоспалительной системы [50, 51].

Исходя из изложенного выше, была предложена гипотеза глиальной дисфункции при БА. В отличие от гипотезы амилоидного каскада акцент делается на персистирующем дезадаптивном нейровоспалении, которое возникает вследствие дисфункции стареющей микроглии и приводит к неэффективности удаления избытка А β и нейротоксическим эффектам. Согласно данной гипотезе, процесс активации микроглии начинается на доклинической стадии БА в области нео-

кортекса и, судя по всему, имеет приспособительный характер на слабые стрессовые стимулы, к которым становится чувствительна стареющая иммунная система [49]. В дальнейшем нейровоспалительный процесс распространяется в вентральном направлении до мозжечка с интенсивной реакцией в медиальных отделах височных долей, что на поздней стадии БА проявляется выраженным отложением тау-белка в гиппокампе [3]. Можно сказать, что из-за метаболических и эпигенетических изменений в процессе старения микроглия, находясь в активированном состоянии, становится более эффективной в отношении стрессовых факторов. Как обратную сторону этого адаптационного механизма можно рассматривать дезадаптационный эффект в виде невозможности адекватного реагирования на стрессоры и истощение микроглии, проявляющееся дистрофическими изменениями с потерей ее функциональных свойств [42, 51]. Описанные изменения при ассоциированном со старением нейровоспалением способствуют активации сериновой рацемазы и повышенной выработке D-серина астроцитами, нейронами и микроглией [49].

Развитие эксайтотоксичности при БА и D-серин

В патогенезе БА важную роль играет развитие эксайтотоксичности – чрезмерной стимуляции NMDA-рецепторов, приводящей к резкому возрастанию тока кальция в постсинаптический нейрон [52]. Морфологически эксайтотоксичность характеризуется отеком дендритов при интактных соме нейрона и аксонах, что рассматривается как проявление вторичных постсинаптических нарушений в результате пресинаптической дисфункции [53, 54].

Предполагается, что D-серин, синтезируемый сериновой рацемазой преимущественно в неактивированных астроцитах и нейронах, связывается в основном с синаптическими NMDA-рецепторами и облегчает глутаматергическую нейротрансмиссию, создавая благоприятный трофический эффект (рис. 1). А β , осуществляя стимуляцию экспрессии сериновой рацемазы в реактивных астроцитах, увеличивает количество вырабатываемого D-серина. Вместе с D-серином, продуцируемым активированной микроглией, данные изменения приводят к появлению нового пула D-серина, который высвобождается во внеклеточное пространство для активации внесинаптических NMDA-рецепторов, вызывая эксайтотоксические эффекты с дистрофическими изменениями и некрозом нейронов (рис. 2) [55, 56].

Нельзя исключить, что изначальное увеличение уровня D-серина, связанное с активированной микроглией и индукцией А β , представляет собой адаптивный механизм, направленный на сохранение синаптической передачи при латентных и ранних стадиях БА [10, 17]. В дальнейшем по мере прогрессирования нейровоспалительной реакции данный механизм может обусловить сверхактивацию NMDA-рецепторов, что на поздних

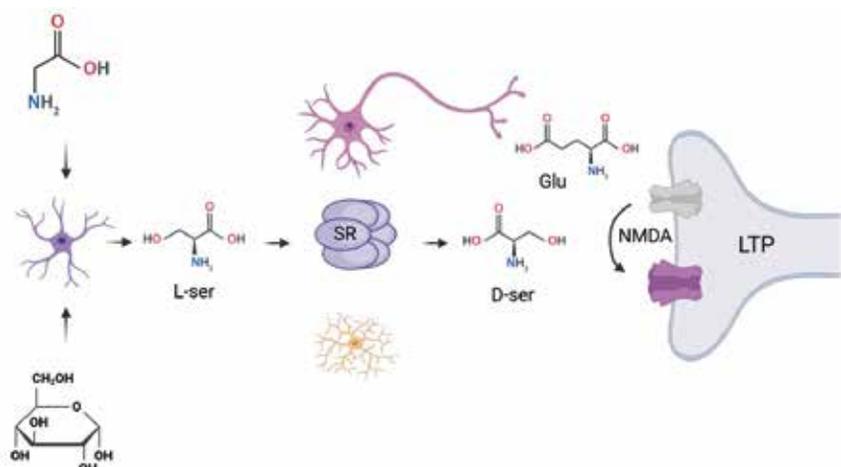


Рис. 1. Физиологическое действие D-серина в нервной системе.

L-серин в астроцитах может синтезироваться из глицина или из глюкозы либо поступать из внеклеточной среды. Астроцитарный L-серин доставляется в нейроны. Под действием сериновой рацемазы нейронов и в меньшей степени самих астроцитов и микроглии L-серин превращается в D-серин. Связываясь с синаптическим NMDA-рецептором, D-серин способствует глутаматергической передаче нервного импульса и формированию LTP

L-ser – L-серин, D-ser – D-серин, SR – сериновая рацемаза, Glu – глутамат, LTP – долговременная потенция, NMDA – рецепторы NMDA

Fig. 1. Physiological effect of D-serine in the nervous system.

L-serine in astrocytes can be synthesized from glycine or glucose or come from the extracellular environment. Astrocytic L-serine is delivered to neurons. Under the action of serine racemase in neurons and, to a lesser extent, in astrocytes and microglia themselves, L-serine is converted to D-serine. By binding to the synaptic NMDA receptor, D-serine promotes glutamatergic nerve impulse transmission and LTP formation

L-ser – L-serine, D-ser – D-serine, SR – serine racemase, Glu – glutamate, LTP – long-term potentiation, NMDA – NMDA receptors

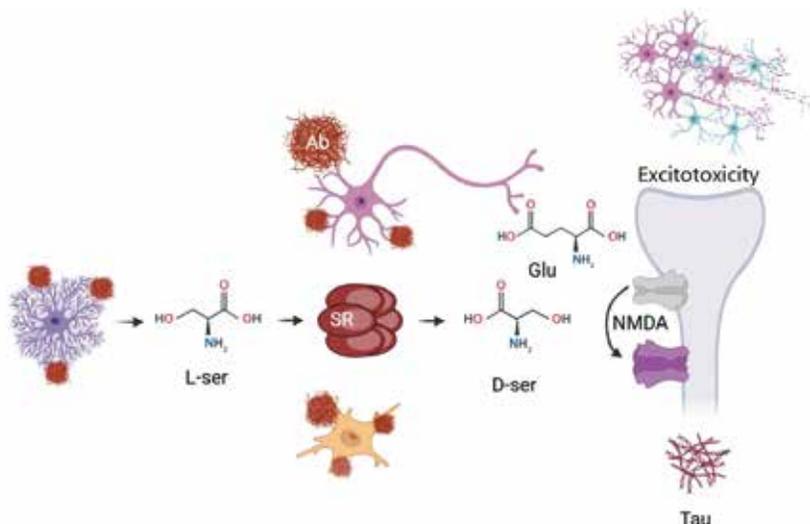


Рис. 2. Эффекты D-серина при болезни Альцгеймера.

Бета-амилоид стимулирует экспрессию сериновой рацемазы в реактивных воспалительных астроцитах и в активированной микроглии. Повышенное количество D-серина высвобождается во внеклеточное пространство и активирует внесинаптические NMDA-рецепторы, что приводит к эксайтотоксическим эффектам с дистрофическими изменениями и некрозом нейронов, а также способствует ускоренному формированию тау-белка

L-ser – L-серин, D-ser – D-серин, SR – сериновая рацемаза, Ab – бета-амилоид, Glu – глутамат, NMDA – рецепторы NMDA, excitotoxicity – эксайтотоксичность, Tau – тау-белок

Fig. 2. The effects of D-serine in Alzheimer's disease.

Amyloid beta stimulates the expression of serine racemase in reactive inflammatory astrocytes and activated microglia. An increased amount of D-serine is released into the extracellular space and activates extrasynaptic NMDA receptors, which leads to excitotoxic effects with dystrophic changes and neuronal necrosis, as well as contributes to the accelerated formation of tau protein

L-ser – L-serine, D-ser – D-serine, SR – serine racemase, Ab – amyloid beta, Glu – glutamate, NMDA – NMDA receptors, Tau – tau protein

стадиях болезни приводит к развитию эксайтотоксичности, ухудшает клиническую картину и способствует прогрессированию БА [11]. Возникает состояние, при котором избыточная выработка D-серина ингибирует апоптоз нейронов на ранних стадиях, но стимулирует их некроз на более поздних стадиях заболевания [57, 58].

Есть основания полагать, что эксайтотоксическое действие D-серина приводит к снижению активности фосфатаз и ускоренной агрегации тау-белка в нейронах. Подобный механизм описан для хинолиновой кислоты, активно выделяемой микроглией при нейровоспалении и обладающей эксайтотоксичностью за счет стимуляции NMDA-рецепторов. Кислота, взаимодействуя с GluN3A субъединицей NMDA-рецептора, ведет к распаду комплекса GluN3A–PP2A. Протеинфосфатаза 2A (PP2A) вместе с GluN3A способствует высокой фосфатазной активности в нейроне, а распад этой связи приводит к гиперфосфорилированию и ускоряет формирование агрегатов тау-белка в нейронах [38].

На основании изложенного выше высказано предположение, что физиологическое старение характеризуется снижением синтеза D-серина с уменьшением активности NMDA-рецепторов, редукцией величины LTP и нарушением нейронной пластичности (введение D-серина предотвращает этот процесс). Патологическое дезадаптивное старение, отягощенное нейродегенеративными заболеваниями, сопровождается повышенной активностью сериновой рацемазы, гиперстимуляцией NMDA-рецепторов и формированием эксайтотоксичности, что приводит к гибели нейронов и деменции [10, 11, 59].

Диагностический и лечебный потенциал D-аминокислот

На моделях старых животных и у пациентов с БА уровни D-серина в ткани головного мозга и ликворе повышаются и могут расцениваться как биомаркеры заболевания [59–61], но существуют также данные, что уровни D-серина могут не изменяться [62–64]. Возможно, указанное противоречие следует из того, что разные отделы головного мозга изначально содержат неодинаковые уровни D-серина, а выраженность и топография патологического процесса могут еще в большей степени изменять это соотношение, в связи с чем утверждение о повышении уровня D-серина в головном мозге при БА требует более тщательного комплексного клинико-морфологического и биохимического исследования [12, 17].

В белом веществе головного мозга у пациентов с БА обнаружено значительно меньшее содержание D-аспартата по сравнению со здоровыми людьми. При этом в ликворе у пациентов с БА уровни D-аспартата были, наоборот, выше, что также требует дальнейших исследований. Содержание D-аспартата и L-аспартата в сыворотке крови не выявило каких-либо статистически значимых различий между пациентами с БА и здоровыми лицами [10].

В исследовании, включающем как пациентов с умеренными когнитивными нарушениями, так и с БА разной степени выраженности, отмечалось, что уровень D-глутамата в сыворотке крови отрицательно коррелировал с показателями поведения по ADAS-cog (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale – шкала, используемая для клинической оценки выраженности симптомов при БА) [65]. При этом в случае оценки уровня D-аланина с показателями поведения по ADAS-cog корреляция была, наоборот, положительная, что может указывать на разнонаправленное действие этих энантиомеров в модуляции синаптической передачи при нейродегенерации [29]. Оценка содержания D-аргинина в ликворе желудочков при БА и у здоровых лиц статистически значимую разницу не выявила [10].

С.Н. Lin et al. [23] предложили использовать уровень DAAO как биомаркер БА на основании того, что уровень DAAO повышается в сыворотке крови как у пациентов с БА, так и у пациентов с умеренными когнитивными расстройствами. Следует также отметить, что в данной работе зависимость между изменением уровней DAAO, D-глутамата и D-серина при когнитивном дефиците от возраста, пола и образования пациентов не обнаружена. Если принимать во внимание только эти показатели, отсутствие данной зависимости свидетельствует о том, что процесс физиологического старения теоретически не должен сопровождаться снижением когнитивного потенциала. При этом не исключается повышение уровней DAAO и D-аминокислот с увеличением возраста пациентов. С другой стороны, значительная положительная корреляция между уровнем того же D-серина в сыворотке крови и возрастом наблюдалась у пациентов с БА, но не у здоровых лиц [59]. Уровни DAAO в сыворотке крови у пациентов с когнитивными нарушениями в целом выше, что подтверждает гипотезу о гипофункции синаптической передачи, опосредованной NMDA-рецепторами, при умеренных когнитивных расстройствах и БА [66].

В рандомизированном контролируемом клиническом исследовании, проведенном М. Avellar et al. [67], 50 здоровых пожилых людей получали однократную дозу D-серина или плацебо с дальнейшей оценкой влияния D-серина на результаты когнитивных тестов и шкалу настроения. Однократный прием D-серина улучшил результаты теста на пространственную память, обучение и решение задач в лабиринте Гротона. При этом участники исследования, у которых уровень D-серина в плазме крови был выше, имели и более высокие результаты указанных тестов.

Заключение

Болезнь Альцгеймера – ассоциированное со старением заболевание сложного патогенеза. В его основе лежат нарушения механизмов адаптации, важнейшим проявлением которых является дисфункция микроглии под действием метаболических и эпигенетических

факторов. Эксайтотоксичность с последующей нейродегенерацией — ключевое событие в патогенетической цепи заболевания и напрямую связана с нарушением обмена модулирующих молекул NMDA-рецепторов, которые представлены D-аминокислотами. Несмотря на наличие публикаций по данной проблеме, оценка содержания D-аминокислот в ткани головного мозга и биологических жидкостях — ликворе и сыворотке крови — по-прежнему остается сложной задачей. Это обусловлено необходимостью использования высокочувствительных дорогостоящих методов, а также отсутствием достаточного объема стандартизированных данных, которые могли бы сформировать определенные референсные значения. В результате роль D-аминокислот, включая D-серин, остается практически неизученной.

Перспективными представляются проведение комплексных исследований с определением содержания D-аминокислот и изучение морфологических изменений ткани головного мозга при болезни Альцгеймера с иммуногистохимическим анализом аномальных белков и сериновой рацемазы в соответствующих структурах головного мозга. Полученные таким образом данные помогут уточнить механизмы протеинопатий и взаимосвязи между процессами нейровоспаления и нейродегенерации, которые являются ключевыми для оценки динамики морфогенеза болезни Альцгеймера и возрастных изменений при старении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Perl DP.* Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med J Transl Pers Med.* 2010;77(1):32–42. DOI: 10.1002/msj.20157.
2. *DeTure MA, Dickson DW.* The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):32. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.
3. *Leng F, Edison P.* Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021;17(3):157–72. DOI: 10.1038/s41582-020-00435-y.
4. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2021;17(3):327–406. DOI: 10.1002/alz.12328.
5. *Jellinger KA.* Neuropathology of the Alzheimer's continuum: an update. *Free Neuropathol.* 2020;1:1–32. DOI: 10.17879/freeneuropathology-2020-3050.
6. *Steiner H, Fukumori A, Tagami S, Okochi M.* Making the final cut: pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase. *Cell Stress.* 2018;2(11):292–310. DOI: 10.15698/cst2018.11.162.
7. *Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, Gordon BA, Hassentab J, Benzinger TLS et al.* A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2020;26(3):398–407. DOI: 10.1038/s41591-020-0781-z.
8. *Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X.* Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener.* 2020;15(1):30. DOI: 10.1186/s13024-020-00376-6.
9. *Dyakin VV, Wisniewski TM, Lajtha A.* Racemization in post-translational modifications relevance to protein aging, aggregation and neurodegeneration: tip of the iceberg. *Symmetry (Basel).* 2021;13(3):455. DOI: 10.3390/sym13030455.
10. *Piubelli L, Murtas G, Rabattoni V, Pollegioni L.* The role of D-amino acids in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;80(2):475–92. DOI: 10.3233/JAD-201217.
11. *Orzylowski M, Fujiwara E, Mousseau DD, Baker GB.* An overview of the involvement of D-serine in cognitive impairment in normal aging and dementia. *Front Psychiatry.* 2021;12:754032. DOI: 10.3389/fpsy.2021.754032.
12. *Mango D, Ledonne A.* Updates on the physiopathology of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRI)-dependent long-term depression. *Cells.* 2023;12(12):1588. DOI: 10.3390/cells12121588.
13. *Westi EW, Molhemi S, Hansen CT, Skoven CS, Knopper RW, Ahmad DA et al.* Comprehensive analysis of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease using dMRI, immunohistochemistry, and neuronal and glial functional metabolic mapping. *Biomolecules.* 2024;14(10):1294. DOI: 10.3390/biom14101294.
14. *Morrison JH, Baxter MG.* The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):240–50. DOI: 10.1038/nrn3200.
15. *Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M et al.* Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 2014;63(Suppl 1):S191–203. DOI: 10.33549/physiolres.932678.
16. *Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M et al.* Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell.* 2012;150(3):633–46. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.029.
17. *Guercio GD, Panizzutti R.* Potential and challenges for the clinical use of d-serine as a cognitive enhancer. *Front Psychiatry.* 2018;9:14. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00014.
18. *Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN.* D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J.* 2008;275(14):3514–26. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06515.x.
19. *Williams SM, Diaz CM, Macnab LT, Sullivan RK, Pow DV.* Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia.* 2006;53(4):401–11. DOI: 10.1002/glia.20300.
20. *Wolosker H, Balu DT, Coyle JT.* The rise and fall of the d-serine-mediated gliotransmission hypothesis. *Trends Neurosci.* 2016;39(11):712–21. DOI: 10.1016/j.tins.2016.09.007.
21. *Fuchs SA, Dorland L, de Sain-van der Velden MG, Hendriks M, Klomp LW, Berger R et al.* D-serine in the developing human central nervous system. *Ann Neurol.* 2006;60(4):476–80. DOI: 10.1002/ana.20977.
22. *Benke PJ, Hidalgo RJ, Braffman BH, Jans J, Gassen KLIV, Sunbul R et al.* Infantile serine biosynthesis defect due to phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: variability in phenotype and treatment response, novel mutations, and diagnostic challenges. *J Child Neurol.* 2017;32(6):543–9. DOI: 10.1177/0883073817690094.

23. Lin CH, Yang HT, Chiu CC, Lane HY. Blood levels of D-amino acid oxidase vs. D-amino acids in reflecting cognitive aging. *Sci Rep.* 2017;7(1):14849. DOI: 10.1038/s41598-017-13951-7.
24. Patel AV, Kawai T, Wang L, Rubakhin SS, Sweedler JV. Chiral measurement of aspartate and glutamate in single neurons by large-volume sample stacking capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 2017;89(22):12375–82. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03435.
25. Errico F, Nisticò R, Napolitano F, Mazzola C, Astone D, Pisapia T et al. Increased D-aspartate brain content rescues hippocampal age-related synaptic plasticity deterioration of mice. *Neurobiol Aging.* 2011;32(12):2229–43. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.002.
26. Ota N, Shi T, Sweedler JV. D-aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. *Amino Acids.* 2012;43(5):1873–86. DOI: 10.1007/s00726-012-1364-1.
27. Errico F, Nisticò R, Napolitano F, Oliva AB, Romano R, Barbieri F et al. Persistent increase of D-aspartate in D-aspartate oxidase mutant mice induces a precocious hippocampal age-dependent synaptic plasticity and spatial memory decay. *Neurobiol Aging.* 2011;32(11):2061–74. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.007.
28. Nuzzo T, Feligioni M, Cristino L, Pagano I, Marcelli S, Iannuzzi F et al. Free d-aspartate triggers NMDA receptor-dependent cell death in primary cortical neurons and perturbs JNK activation, Tau phosphorylation, and protein SUMOylation in the cerebral cortex of mice lacking d-aspartate oxidase activity. *Exp Neurol.* 2019;317:51–65. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.02.014.
29. Lee CJ, Qiu TA, Sweedler JV. D-alanine: distribution, origin, physiological relevance, and implications in disease. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics.* 2020;1868(11):140482. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140482.
30. Canteros MG. D-arginine as a neuroprotective amino acid: promising outcomes for neurological diseases. *Drug Discov Today.* 2014;19(5):627–36. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.010
31. Aso K, Nishigawa T, Nagamachi S, Takakura M, Furuse M. Orally administrated D-arginine exhibits higher enrichment in the brain and milk than L-arginine in ICR mice. *J Vet Med Sci.* 2020;82(3):307–13. DOI: 10.1292/jvms.19-0630.
32. Weatherly CA, Du S, Parpia C, Santos PT, Hartman AL, Armstrong DW. D-amino acid levels in perfused mouse brain tissue and blood: a comparative study. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8(6):1251–61. DOI: 10.1021/acchemneuro.6b00398.
33. Nohesara S, Abdolmaleky HM, Thiagalingam S, Zhou JR. Gut microbiota defined epigenomes of Alzheimer's and Parkinson's diseases reveal novel targets for therapy. *Epigenomics.* 2024;16(1):57–77. DOI: 10.2217/epi-2023-0342.
34. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 2013;35(5):601–12. DOI: 10.1007/s00281-013-0382-8.
35. Anwar MM, Pérez-Martínez L, Pedraza-Alva G. Exploring the significance of microglial phenotypes and morphological diversity in neuroinflammation and neurodegenerative diseases: from mechanisms to potential therapeutic targets. *Immunol Invest.* 2024;53(6):891–946. DOI: 10.1080/08820139.2024.2358446.
36. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation.* 2004;1(1):14. DOI: 10.1186/1742-2094-1-14.
37. Lue LF, Beach TG, Walker DG. Alzheimer's disease research using human microglia. *Cells.* 2019;8(8):838. DOI: 10.3390/cells8080838.
38. Kitazawa M, Yamasaki TR, Laferla FM. Microglia as a potential bridge between the amyloid β -peptide and tau. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1035(1):85–103. DOI: 10.1196/annals.1332.006.
39. Welikovitsh LA, Do Carmo S, Maglóczy Z, Szocsics P, Lóke J, Freund T et al. Evidence of intraneuronal A β accumulation preceding tau pathology in the entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* 2018;136(6):901–17. DOI: 10.1007/s00401-018-1922-z.
40. Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology.* 2015;96(Pt A):29–41. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.028.
41. Swanson MEV, Scotter EL, Smyth LCD, Murray HC, Ryan B, Turner C et al. Identification of a dysfunctional microglial population in human Alzheimer's disease cortex using novel single-cell histology image analysis. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):170. DOI: 10.1186/s40478-020-01047-9.
42. Wang C, Zong S, Cui X, Wang X, Wu S, Wang L et al. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease. *Front Immunol.* 2023;14:1117172. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1117172.
43. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006;112(4):389–404. DOI: 10.1007/s00401-006-0127-z.
44. Dadwal S, Heneka MT. Microglia heterogeneity in health and disease. *FEBS Open Bio.* 2024;14(2):217–29. DOI: 10.1002/2211-5463.13735.
45. Phillips JM, Winfree RL, Seto M, Schneider JA, Bennett DA, Dumitrescu LC et al. Pathologic and clinical correlates of region-specific brain GFAP in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2024;148(1):69. DOI: 10.1007/s00401-024-02828-5.
46. Savage JC, Carrier M, Tremblay ME. Morphology of microglia across contexts of health and disease. *Methods Mol Biol.* 2019;2034:13–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-9658-2_2.
47. Singh D. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):206. DOI: 10.1186/s12974-022-02565-0.
48. Feng D, Huang A, Yan W, Chen D. CD200 dysfunction in neuron contributes to synaptic deficits and cognitive impairment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;516(4):1053–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.06.134.
49. Beltrán-Castillo S, Eugenín J, von Bernhardi R. Impact of aging in microglia-mediated D-serine balance in the CNS. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7219732. DOI: 10.1155/2018/7219732.
50. Fulop T, Larbi A, Pawelec G, Khalil A, Cohen AA, Hirokawa K et al. Immunology of aging: the birth of inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023;64(2):109–22. DOI: 10.1007/s12016-021-08899-6.

51. *Jurcau MC, Jurcau A, Cristian A, Hogevo VO, Diaconu RG, Nunkoo VS.* Inflammaging and brain aging. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10535. DOI: 10.3390/ijms251910535.
52. *Connolly NM, Prehn JH.* The metabolic response to excitotoxicity – lessons from single-cell imaging. *J Bioenerg Biomembr.* 2015;47(1-2):75–88. DOI: 10.1007/s10863-014-9578-4.
53. *Wang Y, Qin ZH.* Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.* 2010;15(11):1382–402. DOI: 10.1007/s10495-010-0481-0.
54. *Barthet G, Mulle C.* Presynaptic failure in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2020;194:101801. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101801.
55. *Huang YJ, Lin CH, Lane HY, Tsai GE.* NMDA neurotransmission dysfunction in behavioral and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol.* 2012;10(3):272–85. DOI: 10.2174/157015912803217288.
56. *Coyle JT, Balu D, Wolosker H.* D-serine, the shape-shifting NMDA receptor co-agonist. *Neurochem Res.* 2020;45(6):1344–53. DOI: 10.1007/s11064-020-03014-1.
57. *Esposito S, Pristerà A, Maresca G, Cavallaro S, Felsani A, Florenzano F et al.* Contribution of serine racemase/d-serine pathway to neuronal apoptosis: serine racemase in neuronal apoptosis. *Aging Cell.* 2012;11(4):588–98. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00822.x.
58. *Canu N, Ciotti MT, Pollegioni L.* Serine racemase: a key player in apoptosis and necrosis. *Front Synaptic Neurosci.* 2014;6:9. DOI: 10.3389/fnsyn.2014.00009.
59. *Madeira C, Lourenco MV, Vargas-Lopes C, Suemoto CK, Brandão CO, Reis T et al.* D-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. *Transl Psychiatry.* 2015;5(5):e561. DOI: 10.1038/tp.2015.52.
60. *Piubelli L, Pollegioni L, Rabattoni V, Mauri M, Princiotta Cariddi L, Versino M et al.* Serum D-serine levels are altered in early phases of Alzheimer's disease: towards a precocious biomarker. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):77. DOI: 10.1038/s41398-021-01202-3.
61. *Chang CH, Kuo HL, Ma WF, Tsai HC.* Cerebrospinal fluid and serum d-serine levels in patients with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Med.* 2020;9(12):3840. DOI: 10.3390/jcm9123840.
62. *Biemans EA, Verhoeven-Duif NM, Gerrits J, Claassen JA, Kuiperij HB, Verbeek MM.* CSF d-serine concentrations are similar in Alzheimer's disease, other dementias, and elderly controls. *Neurobiol Aging.* 2016;42:213–6. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.017.
63. *Nuzzo T, Miroballo M, Casamassa A, Mancini A, Gaetani L, Nisticò R et al.* Cerebrospinal fluid and serum d-serine concentrations are unaltered across the whole clinical spectrum of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics.* 2020;1868(12):140537. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140537.
64. *Nagata Y, Borghi M, Fisher GH, D'Aniello A.* Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain Res Bull.* 1995;38(2):181–3. DOI: 10.1016/0361-9230(95)00087-U.
65. *Lin CH, Yang HT, Lane HY.* D-glutamate, D-serine, and D-alanine differ in their roles in cognitive decline in patients with Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019;185:172760. DOI: 10.1016/j.pbb.2019.172760.
66. *Lin CH, Huang YJ, Lin CJ, Lane HY, Tsai G.* NMDA neurotransmission dysfunction in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2014;20(32):5169–79. DOI: 10.2174/1381612819666140110115603.
67. *Avellar M, Scoriels L, Madeira C, Vargas-Lopes C, Marques P, Dantas C et al.* The effect of D-serine administration on cognition and mood in older adults. *Oncotarget.* 2016;7(11):11881–8. DOI: 10.18632/oncotarget.7691.

Информация об авторах

Валерий Викторович Литвинов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, старший научный сотрудник кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета.

Генриетта Герхардовна Фрейн – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Мария Владимировна Степанова – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры общей и биоорганической химии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Author information

Valeriy V. Litvinov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, E.A. Vagner Perm State Medical University; Senior Researcher, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University. <https://orcid.org/0000-0002-0300-4424>

Genrietta G. Freynd – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, E.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2861-4878>

Maria V. Stepanova – Cand. Sci. (Chem.), Senior Lecturer, General and Bioorganic Chemistry Department, E.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-3664-5447>

Особенности воспалительной реакции в предстательной железе при ее доброкачественной гиперплазии и раке в зависимости от наличия вирусной инфекции

Л.М. Михалева^{1,2}, А.А. Камалов^{3,4}, В.К. Карпов^{2,4},
Н.К. Шахпазян^{1,2}, О.А. Османов^{2,4}, В.В. Печникова^{1,2}

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

² ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 имени академика Г.М. Савельевой Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» обособленное подразделение Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

Резюме. *Введение.* Хронические инфекции и воспалительные заболевания способствуют развитию злокачественных опухолей. Предложена гипотеза о связи хронического воспаления с опухолями предстательной железы, так как воспалительные инфильтраты выявляются у пациентов с раком предстательной железы и ее доброкачественной гиперплазией, причем хроническое воспаление при доброкачественной гиперплазии почти вдвое увеличивает риск рака. Вирусные инфекции могут способствовать хроническому воспалению и канцерогенезу, однако данные по предстательной железе противоречивы. Цель исследования – выявить особенности воспалительной реакции у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и раком предстательной железы с наличием/отсутствием вирусной инфекции.

Материалы и методы. В исследование включен биопсийный и операционный материал, полученный от 145 пациентов, прооперированных по поводу доброкачественной гиперплазии предстательной железы и рака предстательной железы. Проведены патологоанатомическое исследование и анализ полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на наличие вирусов папилломы человека, вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр, вируса герпеса 6-го типа. На основании результатов полимеразной цепной реакции случаи разделены на четыре подгруппы: доброкачественная гиперплазия предстательной железы и рак предстательной железы с наличием/отсутствием вирусной инфекции. Далее были отобраны и проанализированы 15 наблюдений из каждой подгруппы исследования для оценки воспаления в биопсийном и операционном материале, окрашенном гематоксилином и эозином. Использована стандартизированная гистологическая классификация.

Результаты. При наличии вирусной инфекции в предстательной железе доминировал перигландулярный паттерн воспалительной инфильтрации, мультифокальная распространенность инфильтрата, интенсивность воспаления варьировала от умеренной до тяжелой степени тяжести. Напротив, при отсутствии вирусной инфекции в предстательной железе наблюдалась более слабая, очаговая стромальная воспалительная инфильтрация.

Заключение. Наличие вирусной инфекции в предстательной железе при ее доброкачественной гиперплазии и раке приводит к большей распространенности и интенсивности воспалительной инфильтрации, сосредоточенной вокруг железистого компонента органа, что может свидетельствовать о различиях в патогенезе данных заболеваний и иметь значение для диагностики и терапии.

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы, рак предстательной железы, вирусная инфекция, воспаление

Для корреспонденции: Валентина Викторовна Печникова. E-mail: valiagtx@yandex.ru

Для цитирования: Михалева Л.М., Камалов А.А., Карпов В.К., Шахпазян Н.К., Османов О.А., Печникова В.В. Особенности воспалительной реакции в предстательной железе при ее доброкачественной гиперплазии и раке в зависимости от наличия вирусной инфекции. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):15–24. DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.15-24.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (№ 124021600057-0).

Статья поступила 25.11.2024. **Получена после рецензирования** 11.12.2024. **Принята в печать** 17.02.2025.

Features of inflammatory response in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer depending on the presence of viral infection

L.M. Mikhaleva^{1,2}, A.A. Kamalov^{3,4}, V.K. Karpov^{2,4},
N.K. Shakhpazyan^{1,2}, O.A. Osmanov^{2,4}, V.V. Pechnikova^{1,2}

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

² Savelyeva City Clinical Hospital No. 31, Moscow, Russia

³ Medical Research and Education Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Chronic infections and inflammatory diseases contribute to the development of malignancies. An association between chronic inflammation and prostate cancer has recently been hypothesized, as inflammatory infiltrates are detected in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, with chronic inflammation in the latter nearly doubling the risk of prostate cancer. Viral infections may contribute to chronic inflammation and carcinogenesis, but data on prostatic hyperplasia are inconsistent. We aimed to identify the features of inflammatory response in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer with and without viral infection.

Materials and methods. The study included biopsies and surgical specimens from 145 patients operated on benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. We performed microscopic and real-time polymerase chain reaction examination for human papillomaviruses, human simplex herpesviruses 1 and 2, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human herpesvirus 6. Based on the results of polymerase chain reaction examination, patients were divided into 4 subgroups: benign prostatic hyperplasia with and without a viral infection and prostate cancer with and without viral infection. Fifteen samples from each subgroup were stained with hematoxylin and eosin using the standardized histologic classification and then analyzed to evaluate inflammation response.

Results. In viral infection, the prostate was characterized by a periglandular pattern of inflammatory infiltration, multifocal prevalence of infiltration, and moderate-to-severe inflammation intensity. In contrast, patients without viral infection showed a weaker focal stromal inflammatory infiltration.

Conclusion. Viral infection in prostate tissue in both benign prostatic hyperplasia and prostate cancer leads to a greater prevalence and intensity of inflammatory infiltration centered around the glandular component of the prostate, which may indicate differences in pathogenesis of these diseases and be important for diagnosis and therapy.

Keywords: benign prostatic hyperplasia, prostate cancer, viral infection, inflammation

Corresponding author: Valentina V. Pechnikova. E-mail: valiagtx@yandex.ru

For citation: Mikhaleva L.M., Kamalov A.A., Karpov V.K., Shakhpazyan N.K., Osmanov O.A., Pechnikova V.V. Features of inflammatory response in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer depending on the presence of viral infection. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):15–24 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.15-24.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Petrovsky National Research Center of Surgery (No. 124021600057-0).

Received 25.11.2024. Received in revised form 11.12.2024. Accepted 17.02.2025.

Введение

По данным литературы известно, что хронические инфекции и воспалительные заболевания непосредственно влияют на развитие эпителиальных злокачественных опухолей, включая рак печени, желудка, мочевого пузыря и толстой кишки [1–4]. Была выдвинута гипотеза, что хроническое воспаление является причиной рака предстательной железы (РПЖ) [5].

Воспалительные инфильтраты часто обнаруживаются в биопсийном и операционном материале предстательной железы, полученном от пациентов с РПЖ, а также пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) [6, 7]. При этом

наличие хронического воспаления при ДГПЖ почти вдвое увеличивает риск развития РПЖ [8]. Вирусная инфекция играет не последнюю роль в индукции хронического воспаления и канцерогенеза в разных органах [9], что касается и предстательной железы, однако результаты исследований на настоящий момент противоречивы [10, 11].

С учетом неоднозначности и ограниченности данных о влиянии вирусной инфекции на воспаление в опухолевых поражениях предстательной железы нами проведено собственное исследование, целью которого стало выявление особенностей воспалительной реакции у пациентов с ДГПЖ и РПЖ с наличием/отсутствием вирусной инфекции.

Материалы и методы

В исследование на основании клинических данных взят биопсийный и операционный материал, полученный от 145 пациентов, прооперированных по поводу ДГПЖ и РПЖ в городской клинической больнице № 31 имени академика Г.М. Савельевой (2019–2023 годы). Критериями включения в исследование являлись возраст пациентов (старше 50 лет), патологоанатомически верифицированный диагноз «доброкачественная гиперплазия предстательной железы» или «рак предстательной железы», наличие результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) на присутствие вирусов в образцах нативных тканей предстательной железы, добровольное информированное согласие пациентов на обработку их медицинских данных. Средний возраст пациентов составил $68,2 \pm 8,7$ года. В отобранных образцах тканей предстательной железы проведены патологоанатомическое исследование и ПЦР в режиме реального времени на наличие в материале вирусов папилломы человека (ВПЧ), вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа (ВПГ-1/2), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), вируса герпеса 6-го типа (ВГЧ-6).

Патоморфологическое исследование полученного биопсийного и операционного материала проводилось по стандартной методике. Материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина и после гистологической проводки в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 300 (Leica Biosystems, Германия) заливали в парафин на станции Leica EG 1150 (Leica Microsystems, Германия). Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином в автоматической станции Leica ST 5010 (Leica Biosystems, Германия). Микроскопическое исследование осуществляли на триокулярном микроскопе Leica DMLB (Leica Microsystems, Германия, объективы $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$) с использованием цифровой камеры Leica DFC 420 (Leica Microsystems, Германия). Захват изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica Application Suite X (LAS X; Leica Microsystems, Германия).

У 54,5% общей выборки (79 человек) при прижизненном патологоанатомическом исследовании биопсийного и операционного материала была диагностирована ДГПЖ, а у 45,4% (66 человек) – РПЖ.

ДНК для проведения ПЦР в режиме реального времени выделяли при помощи реагентов ExtractDNA Blood & Cells («Евроген», Россия) из фрагментов свежемороженых при -70°C тканей согласно инструкции к набору. Для проведения ПЦР использовали термоциклер С1000 с оптическим модулем CFX96 Touch (Bio-Rad, США) и программным обеспечением CFX Manager v.3.1 (Bio-Rad, США). Качественный и количественный анализ ДНК ВПЧ проводили с помощью набора для ПЦР «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия); ДНК ВПГ-1/2 – с помощью набора для ПЦР «АмплиПрайм® HSV I/HSV

II» («НекстБио», Россия); ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 – с помощью набора реагентов для ПЦР «АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6» («НекстБио», Россия) согласно инструкциям к ним.

У 59 мужчин из общей выборки (40,7%) в материале предстательной железы методом ПЦР был выявлен как минимум один вирус: 47% пациентов с РПЖ (31 человек) и 35,4% (28 человек) с ДГПЖ. У 86 мужчин (59,3%) вирус в ткани предстательной железы отсутствовал.

На основании результатов ПЦР пациенты были разделены на четыре подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты с ДГПЖ без вирусной инфекции (ДГПЖ, $n=51$), во вторую подгруппу – пациенты с ДГПЖ в сочетании с вирусной инфекцией (ДГПЖ_{вир}, $n=28$), в третью подгруппу – 35 пациентов с РПЖ без вирусной инфекции (РПЖ) и в четвертую подгруппу – 31 пациент с РПЖ в сочетании с вирусной инфекцией (РПЖ_{вир}). Далее были отобраны 15 наблюдений из каждой подгруппы исследования для оценки воспаления в биопсийном и операционном материале предстательной железы, окрашенном гематоксилином и эозином. Использована гистологическая классификация, предложенная J.C. Nickel et al. [12].

В исследовании учитывались различные параметры воспалительной инфильтрации. Так, по анатомической локализации инфильтрата выделяли glandулярную/железистую (воспалительный инфильтрат в протоковом или железистом эпителии и/или в просвете протоков/желез), перигландулярную (воспалительные инфильтраты в строме, сосредоточены вокруг протоков/желез в пределах 50 мкм) и стромальную (воспалительные клетки в строме предстательной железы, которые не сосредоточены вокруг протоков/желез и находятся на расстоянии, равном 50 мкм от них или более).

По распространенности (площадь ткани предстательной железы, затронутой воспалительной инфильтрацией, при $\times 100$) инфильтраты разделяли на фокальные ($<10\%$), мультифокальные (10–50%) и диффузные ($>50\%$).

Выраженность воспаления (плотность воспалительной инфильтрации) оценивалась как слабая (отдельные клетки воспаления, большинство из которых разделено четкими промежутками, <100 клеток/ мм^2), умеренная (сливающиеся поля клеток воспаления без деструкции тканей и образования лимфоидных узелков/фолликулов, 100–500 клеток/ мм^2), тяжелая (сливающиеся поля клеток воспаления с деструкцией тканей или образованием узелков/фолликулов, >500 клеток/ мм^2). Если в одной анатомической локализации присутствовали разные степени выраженности воспаления, учитывали наихудшую. Расчеты были проведены с использованием среднего значения в 10 полях зрения микропрепаратов.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием пакетов программ Microsoft 365 (США), STATISTICA12 (США), Jamovi

2.5.6 (open-source software). Для проверки распределения количественных величин (возраст пациентов) на нормальность были использованы критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для описания тенденций количественных величин с нормальным распределением задействованы арифметическое среднее (M) и стандартное отклонение (SD). Сравнение качественных данных проводили с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона и точного критерия Фишера, для оценки силы взаимосвязи между качественными переменными использовался критерий V Крамера. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 04/21 от 08.11.2021).

Результаты

Для оценки воспалительной реакции с помощью гистологического метода отобрано 60 образцов доброкачественных и злокачественных опухолей предстательной железы с наличием и отсутствием вирусной инфекции (по 15 наблюдений из каждой подгруппы исследования (ДГПЖ, ДГПЖ_{вир}, РПЖ, РПЖ_{вир}, рис. 1 А–D, 2 А–D). Исследованы такие параметры как локализация, распространенность и степень выраженности воспалительных инфильтратов при доброкачественных и злокачественных новообразованиях предстательной железы.

При исследовании локализации воспалительного инфильтрата в подгруппах выявлено, что при ДГПЖ преобладала стромальная локализация инфильтрата, обнаруженная в 53,34% случаев ($n=8$), на втором месте по частоте встречаемости было перигландулярное воспаление – 46,7% ($n=7$; рис. 3 А, 4 А). Для подгруп-

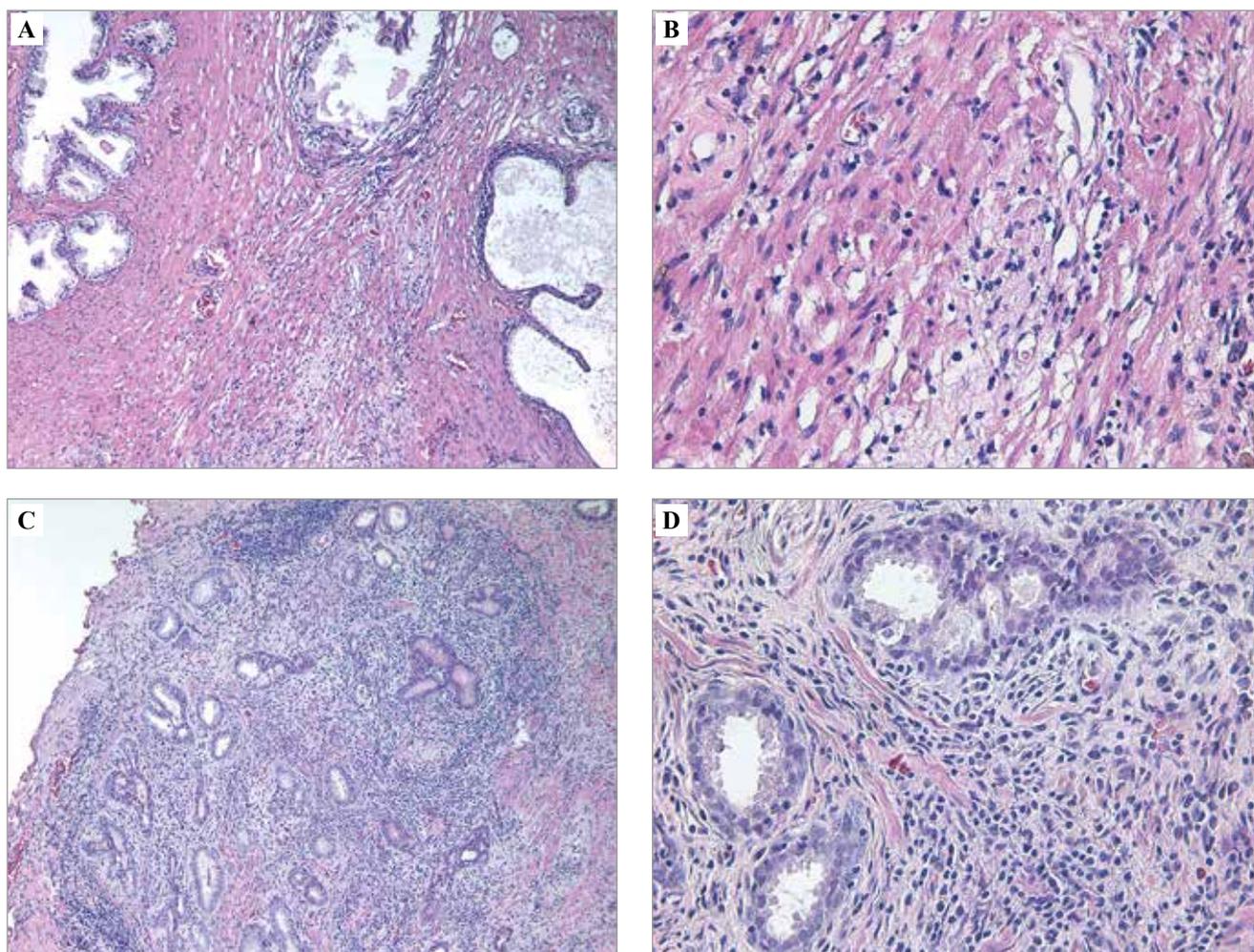


Рис. 1. Микроскопическая картина поражений предстательной железы.

А – подгруппа ДГПЖ, В – подгруппа ДГПЖ, С – подгруппа ДГПЖ_{вир}, D – подгруппа ДГПЖ_{вир}. Окраска гематоксилином и эозином. А, С – $\times 100$; В, D – $\times 400$

Fig. 1. Histological presentation of prostate gland lesions.

А – subgroup of BPH, В – subgroup of BPH, С – subgroup of BPH with viral infection, D – subgroup of BPH with viral infection. H&E stain. А, С – $\times 100$; В, D – $\times 400$

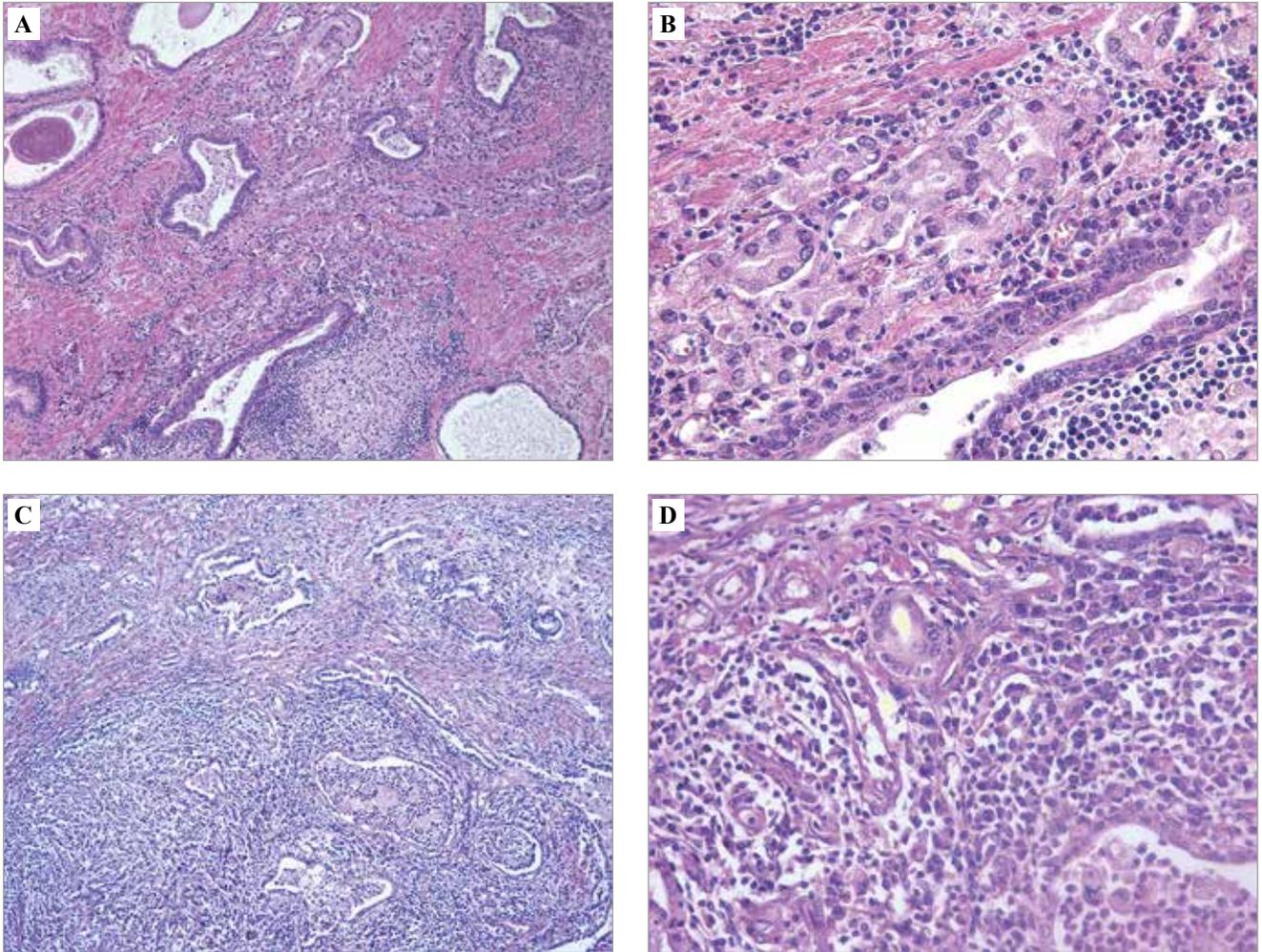


Рис. 2. Микроскопическая картина поражений предстательной железы.

A – подгруппа РПЖ, B – подгруппа РПЖ, C – подгруппа РПЖ_{вир}, D – подгруппа РПЖ_{вир}. Окраска гематоксилином и эозином. A, C – $\times 100$; B, D – $\times 400$

Fig. 2. Histological presentation of prostate gland lesions.

A – subgroup of PC, B – subgroup of PC, C – subgroup of PC with viral infection, D – subgroup of PC with viral infection. H&E stain. A, C – $\times 100$; B, D – $\times 400$

пы ДГПЖ_{вир} оказалась характерна перигландулярная локализация воспалительного инфильтрата, которая выявлена в большинстве наблюдений ($n=13$; 86,7%; рис. 3 A). Стромальное воспаление в данной подгруппе встречалось редко и составило 13,3% ($n=2$; рис. 3 A). В трети наблюдений РПЖ отмечалась стромальная локализация воспалительного инфильтрата ($n=5$; 33,3%), в большинстве случаев преобладало перигландулярное воспаление – 66,7% ($n=10$; рис. 3 A). В подгруппе РПЖ_{вир} воспаление локализовалось только перигландулярно (100%; $n=15$; рис. 3 A, 4 B–D).

Преvalентность glandулярного воспаления во всех четырех подгруппах по данным нашего исследования не выявлена.

При сравнении частоты встречаемости стромальной и перигландулярной локализации в подгруппах исследования обнаружены значимые различия. Для ДГПЖ без вирусной инфекции была характерна стромальная

локализация воспалительного инфильтрата. Напротив, при наличии вирусной нагрузки и/или карциномы доминировала перигландулярная инфильтрация ($\chi^2=13,1$; $p=0,004$). При этом сила связи локализации воспалительного инфильтрата с типом поражения была относительно высокой (V Крамера=0,467).

По распространенности воспалительного инфильтрата в подгруппах исследования показано, что в подгруппе ДГПЖ в подавляющем большинстве случаев отмечалось фокальное (<10% площади ткани предстательной железы) воспаление – 86,7% ($n=13$). Мультифокальное воспаление в данной подгруппе встречалось редко и составило 13,3% наблюдений ($n=2$; рис. 3 B). В подгруппе ДГПЖ_{вир} воспаление было только мультифокальным и занимало от 10 до 50% площади ткани предстательной железы (100%; $n=15$; рис. 3 B). В трети наблюдений РПЖ отмечалось мультифокальное воспаление ($n=5$; 33,3%), в большинстве случаев

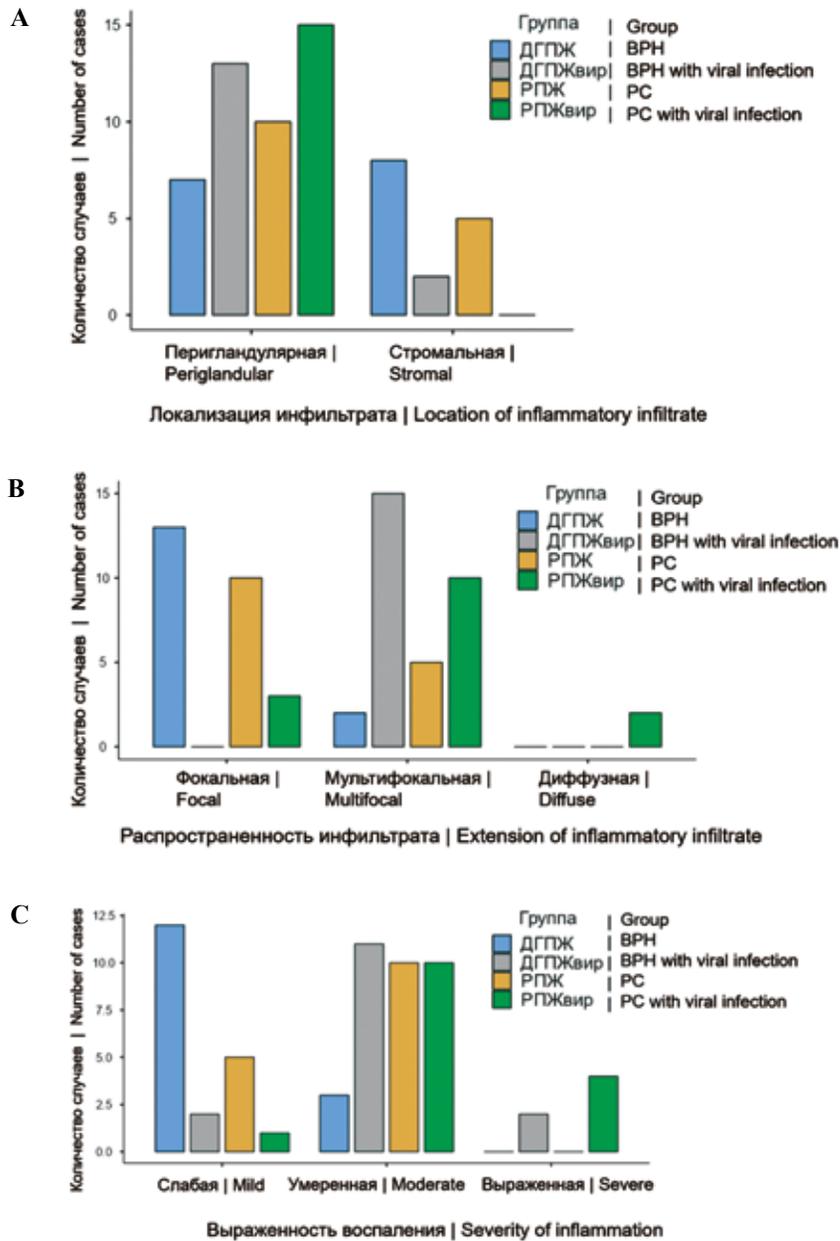


Рис. 3. Характер воспалительной инфильтрации в подгруппах исследования.

А – локализация воспалительного инфильтрата в подгруппах исследования, Б – распространенность воспалительного инфильтрата в подгруппах исследования, С – выраженность воспаления в подгруппах исследования

Fig. 3. Patterns of inflammatory infiltration.

A – location of inflammatory infiltrate, B – extent of inflammatory infiltrate, C – inflammation severity

воспаление было очаговым (фокальным) – 66,7% (n=10; рис. 3 В). В подгруппе РПЖ_{вир} воспаление более чем в половине случаев являлось мультифокальным (n=10; 66,7% наблюдений). Интересной особенностью данной подгруппы явилось выявление диффузного характера воспаления (>50% площади ткани предстательной железы) в двух случаях (13,3%). В оставшейся одной пятой наблюдений воспаление было очаговым (n=3, 20%; рис. 3 В).

При сравнении частоты встречаемости фокальной, мультифокальной и диффузной распростра-

ненности инфильтратов в подгруппах исследования выявлены значимые различия: в подгруппах ДГПЖ и РПЖ без вирусной инфекции чаще наблюдалось фокальное очаговое воспаление (<10% площади предстательной железы), в подгруппах с наличием вирусов (ДГПЖ_{вир}, РПЖ_{вир}) доминировало мультифокальное (10–50% площади) воспаление ($\chi^2=35,0$; $p<0,001$). Диффузная воспалительная инфильтрация обнаружена только в подгруппе карциномы предстательной железы с вирусносительством. Сила связи распространенности воспалительного инфильтра-

та с типом поражения была относительно высокой (V Крамера=0,540).

При исследовании выраженности воспалительной инфильтрации в доброкачественных и злокачественных опухолях предстательной железы выявлено, что в подгруппе ДГПЖ воспаление в подавляющем большинстве случаев являлось слабо выраженным ($n=12$; 80%; рис. 3 С, 4 А), в оставшейся одной пятой наблюдений отмечена умеренная степень выраженности ($n=3$; 20%). В подгруппе ДГПЖ_{вир} выраженность воспаления была разнородной, однако доминировала умеренная степень – 73,3% ($n=11$), слабая и тяжелая степень встречались одинаково часто и составили по 13,3% ($n=2$) от общего количества (рис. 3 С). Подобным образом распределилась степень выраженности вос-

паления и в подгруппе РПЖ. Самой распространенной являлась умеренная степень выраженности – 66,7% случаев ($n=10$), в трети случаев воспаление было слабым (33,3%; $n=5$; рис. 3 С). В последней подгруппе (РПЖ_{вир}) преобладала умеренная степень выраженности воспалительной инфильтрации (66,7% случаев; $n=10$; рис. 3 С, 4 В, С). Важной особенностью данной подгруппы стало выявление тяжелого характера воспаления почти в трети наблюдений (26,7%; $n=4$; рис. 4 D). В одном случае выявлено слабо выраженное воспаление (6,7%; $n=1$).

При сравнении частоты встречаемости слабой, умеренной и тяжелой степени выраженности воспаления в подгруппах исследования также были выявлены значимые различия: для ДГПЖ без вирусной инфекции ха-

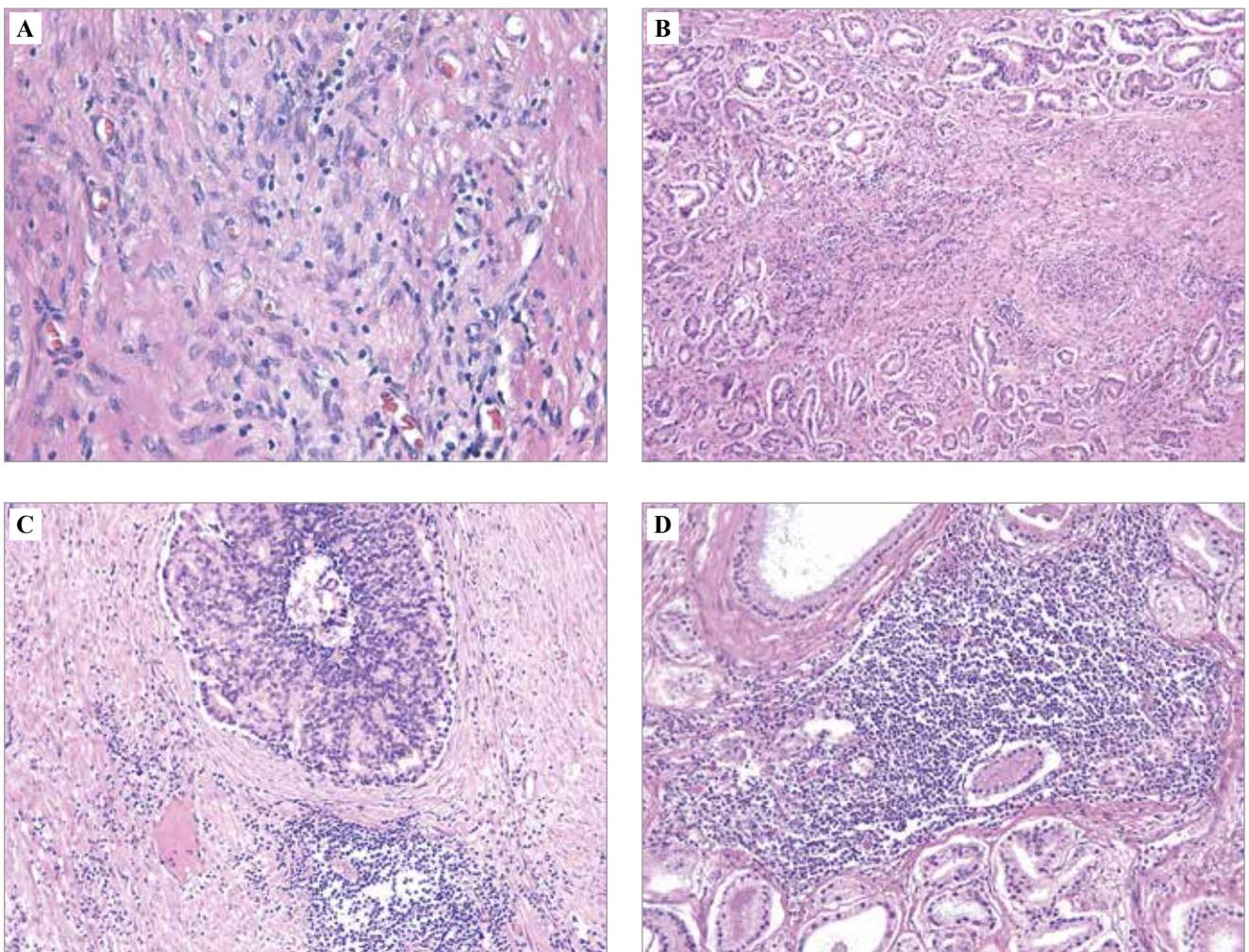


Рис. 4. Характер (локализация и степень интенсивности) воспалительной инфильтрации в подгруппах исследования. А – стромальная слабо выраженная инфильтрация в подгруппе ДГПЖ, В – перигландулярная умеренная инфильтрация в подгруппе РПЖ_{вир}, С – перигландулярная умеренная инфильтрация вокруг крибриформной железы в подгруппе РПЖ_{вир}, D – перигландулярная тяжелая инфильтрация в подгруппе РПЖ_{вир}. Окраска гематоксилином и эозином. А, С, D – $\times 400$; В – $\times 100$

Fig. 4. Patterns (location and severity) of inflammatory infiltration.

A – stromal weak infiltration in the subgroup of BPH, B – periglandular mild infiltration in the subgroup of PC with viral infection, C – periglandular mild infiltration around the cribriform gland in the subgroup of PC with viral infection, D – periglandular severe infiltration in the subgroup of PC with viral infection. H&E stain. A, C, D – $\times 400$; B – $\times 100$

бактерно слабо выраженное воспаление, в подгруппах ДППЖ_{выр}, РПЖ и РПЖ_{выр} преобладала умеренная степень тяжести воспаления, однако только в подгруппах с вирусной инфекцией наблюдалась тяжелая степень выраженности воспалительной инфильтрации с формированием лимфоидных фолликулов и/или деструкцией тканей предстательной железы ($\chi^2=27,0$; $p<0,001$). Сила связи выраженности воспаления с типом поражения была относительно высокой (V Крамера=0,474).

Обсуждение

Связь между хроническим воспалением и злокачественными новообразованиями хорошо задокументирована в научной литературе: на долю воспаления, по разным данным, приходится около 20% всех случаев злокачественных опухолей у человека [5]. Воспалительные процессы в предстательной железе могут быть вызваны разными факторами, среди которых значительную роль играют вирусные и бактериальные инфекции, включая передающиеся половым путем. В то время как острые воспалительные реакции критически важны для элиминации патогенов, хронические и неконтролируемые воспалительные процессы могут привести к повреждению клеток и тканей. Хроническое воспаление ассоциируется с повышенным риском развития как доброкачественных [13, 14], так и злокачественных опухолей предстательной железы [15]. Больше того, хроническое воспаление в микроокружении предстательной железы может изменять опухолевое микроокружение при РПЖ, способствуя прогрессированию опухоли через такие механизмы как пролиферация и выживание клеток, уклонение от иммунного надзора, ремоделирование тканей, выработка ангиогенных факторов, метастатическое распространение и устойчивость к терапевтическим средствам.

Данные о связи между заболеваниями (в том числе РПЖ) и вирусами, инфицирующими предстательную железу, противоречивы. Например, в исследовании случай–контроль не обнаружена связь между инфицированием ВПЧ и симптомами простатита [16], однако метаанализ показал, что у мужчин с ВПЧ-инфекцией в анамнезе увеличена вероятность развития РПЖ [17]. Предыдущие исследования выявили ВПГ в секрете предстательной железы пациентов с симптомами хронического небактериального простатита. Выдвинуто предположение, что инфицирование ВПГ может быть связано с длительными симптомами воспаления в предстательной железе [18]. Тем не менее исследования методом случай–контроль свидетельствуют об отсутствии зависимости между выявлением ВПГ-2 и ВПГ-8 в сыворотке крови пациентов и развитием РПЖ, в то время как некоторые метаанализы показали корреляцию ВПГ-2 с риском РПЖ [19, 20]. Эти исследования демонстрируют, что связь между вирусными инфекциями, местным воспалением и РПЖ неясна, что послужило отправной точкой нашей работы.

В исследовании S.S. Cakir et al. [21] выявлено, что у пациентов с ДППЖ воспалительные инфильтраты были преимущественно очаговыми (49,3%), локализовались стромально (47,4%) и имели слабую интенсивность (52,5%), что полностью соотносится с данными нашего исследования, однако авторы не оценивали наличие инфекционных агентов в ткани предстательной железы и не проводили сравнение с группой РПЖ.

B. Gurel et al. [8] выдвинули гипотезу, что наличие воспаления в предстательной железе ассоциировано с РПЖ, что было впоследствии подтверждено. Так, у мужчин, у которых хотя бы в одном биоптате обнаруживалось воспаление, вероятность развития рака предстательной железы была в 1,78 раза выше по сравнению с теми, у кого воспаление не выявлялось, причем данная связь была более выражена при РПЖ с суммой Глисона 7–10 (отношение шансов = 2,24; 95% доверительный интервал 1,06–4,71). Другими словами, вероятность РПЖ высокой степени злокачественности увеличивалась по мере возрастания количества биоптатов с воспалением. К сожалению, авторы также не проводили исследования на наличие сопутствующей инфекционной патологии у пациентов.

J. Kiś et al. [22] оценили частоту встречаемости ДНК ВЭБ в тканях, собранных у пациентов с РПЖ, а также титры антител к ВЭБ в сыворотке крови. В исследовании были выявлены более высокие титры антител у пациентов с ВЭБ-позитивным РПЖ по сравнению с пациентами с ВЭБ-негативным РПЖ, а также показана связь высокого титра антител с более высокой суммой Глисона и стадией T в опухоли.

Резюмируя наши данные и результаты других исследователей, хроническое воспаление, промотором которого являются вирусные агенты, связано с повышением вероятности развития РПЖ с более агрессивным течением заболевания. Выявление пациентов, подверженных наибольшему риску развития агрессивного заболевания, – первый шаг к предотвращению РПЖ. Результаты нашей работы могут стать основанием для разработки профилактических мер, направленных на мужчин-вирусоносителей, для которых противовирусная терапия окажется наиболее эффективной.

Заключение

Результаты исследования позволили установить, что при вирусной инфекции доминирует перигландулярный паттерн воспалительной инфильтрации и наличие вирусной инфекции приводит к большей распространенности и интенсивности воспалительной инфильтрации в предстательной железе. Выявленные изменения показывают, что наличие вирусной инфекции связано с более выраженной и разнообразной воспалительной реакцией, особенно у пациентов с раком предстательной железы, что может свидетельствовать о различиях в патогенезе заболеваний и иметь значение для диагностики и терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, А.А. Камалов, В.К. Карпов.
Сбор и обработка материала – Н.К. Шахпазян, О.А. Османов, В.В. Печникова.
Написание текста – В.В. Печникова.
Редактирование – Л.М. Михалева, А.А. Камалов, В.К. Карпов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, A.A. Kamalov, V.K. Karpov.
Collected the data and performed the analysis – N.K. Shakhpazyan, O.A. Osmanov, V.V. Pechnikova.
Wrote the paper – V.V. Pechnikova.
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, A.A. Kamalov, V.K. Karpov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interests.

Литература/References

1. Nigam M, Mishra AP, Deb VK, Dimri DB, Tiwari V, Bungau SG et al. Evaluation of the association of chronic inflammation and cancer: insights and implications. *Biomed Pharmacother.* 2023;164:115015. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115015.
2. Wen Y, Zhu Y, Zhang C, Yang X, Gao Y, Li M et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Front Pharmacol.* 2022;13:1040163. DOI: 10.3389/fphar.2022.1040163.
3. Мидибер К.Ю., Бирюков А.Е., Печникова В.В., Грачева Н.А., Шахпазян Н.К., Гюева З.В. и др. Клинико-морфологическая неоднородность рака желудка диффузного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(S4):34–41. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41.
Midiber KYu, Biryukov AE, Pechnikova VV, Gracheva NA, Shakhpazyan NK, Gioeva ZV et al. Clinical and morphological heterogeneity of diffuse gastric cancer. Clinical and experimental morphology. 2021;10(S4):34–41(In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41.
4. Mikhaleva LM, Pechnikova VV, Pshikhachev AM, Rogov KA, Gusniev MA, Patsap OI et al. Bladder cancer: update on risk factors, molecular and ultrastructural patterns. *Curr Med Chem.* 2021;28(41):8517–33. DOI: 10.2174/0929867328666210309111731.
5. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256–69. DOI: 10.1038/nrc2090.
6. Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, Mariotti G, Giuseppe V, Luigi PA et al. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol.* 2003;43(2):164–75. DOI: 10.1016/s0302-2838(02)00548-1.
7. Nickel JC, Downey J, Young I, Boag S. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 1999;84(9):976–81. DOI: 10.1046/j.1464-410x.1999.00352.x.
8. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM Jr, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):847–56. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1126.
9. Schiller JT, Lowy DR. An introduction to virus infections and human cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2021;217:1–11. DOI: 10.1007/978-3-030-57362-1_1.
10. Камалов А.А., Михалева Л.М., Матвеев В.Б., Карпов В.К., Охоботов Д.А., Османов О.А. и др. Вирусные инфекции в канцерогенезе в предстательной железе: обзор литературы. Онкоурология. 2022;18(2):182–189. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-182-189.
Kamalov AA, Mikhaleva LM, Matveev VB, Karpov VK, Okhobotov DA, Osmanov OA et al. Viral infections in prostate carcinogenesis: literature review. *Cancer Urology.* 2022;18(2):182–189 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-182-189.
11. Lawson JS, Glenn WK. Multiple pathogens and prostate cancer. *Infect Agent Cancer.* 2022;17(1):23. DOI: 10.1186/s13027-022-00427-1.
12. Nickel JC, True LD, Krieger JN, Berger RE, Boag AH, Young ID. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. *BJU Int.* 2001;87(9):797–805. DOI: 10.1046/j.1464-410x.2001.02193.x.
13. Gandaglia G, Briganti A, Gontero P, Mondaini N, Novara G, Salonia A et al. The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). *BJU Int.* 2013;112(4):432–41. DOI: 10.1111/bju.12118.
14. De Nunzio C, Presicce F, Tubaro A. Inflammatory mediators in the development and progression of benign prostatic hyperplasia. *Nat Rev Urol.* 2016;13(10):613–26. DOI: 10.1038/nrurol.2016.168.
15. Archer M, Dogra N, Kyprianou N. Inflammation as a driver of prostate cancer metastasis and therapeutic resistance. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):2984. DOI: 10.3390/cancers12102984.
16. Bartoletti R, Cai T, Meliani E, Mondaini N, Meacci F, Addonizio P et al. Human papillomavirus infection is not related with prostatitis-related symptoms: results from a case-control study. *Int Braz J Urol.* 2014;40(2):247–56. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.02.16.
17. Taylor ML, Mainous AG 3rd, Wells BJ. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *Fam Med.* 2005;37(7):506–12. PMID: 15988645.
18. Doble A, Harris JR, Taylor-Robinson D. Prostatodynia and herpes simplex virus infection. *Urology.* 1991;38(3):247–8. DOI: 10.1016/s0090-4295(91)80355-b.
19. Korodi Z, Wang X, Tedeschi R, Knekt P, Dillner J. No serological evidence of association between prostate cancer and infection with herpes simplex virus type 2 or human herpesvirus type 8: a nested case-control study. *J Infect Dis.* 2005;191(12):2008–11. DOI: 10.1086/430354.
20. Ge X, Wang X, Shen P. Herpes simplex virus type 2 or human herpesvirus 8 infection and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Biomed Rep.* 2013;1(3):433–9. DOI: 10.3892/br.2013.82.
21. Cakir SS, Polat EC, Ozcan L, Besiroglu H, Ötuncemur A, Ozbek E. The effect of prostatic inflammation on clinical outcomes in patients with benign prostate hyperplasia. *Prostate Int.* 2018;6(2):71–4. DOI: 10.1016/j.pnil.2017.12.003.
22. Kiś J, Góralczyk M, Sikora D, Stępień E, Drop B, Polz-Dacewicz M. Can the Epstein-Barr virus play a role in the development of prostate cancer? *Cancers (Basel).* 2024;16(2):328. DOI: 10.3390/cancers16020328.

Информация об авторах

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Армаис Альбертович Камалов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Валерий Кузьмич Карпов – кандидат медицинских наук, врач-уролог урологического отделения ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой, доцент кафедры урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Николай Константинович Шахпазян – кандидат медицинских наук, заведующий группой молекулярной биологии и генетики с функциями биометрии, биомедицины и биомедицинской статистики референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, врач клинической лабораторной диагностики патологоанатомического отделения ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Омар Асланович Османов – врач-уролог урологического отделения ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой, аспирант кафедры урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Валентина Викторовна Печникова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Author information

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Head of the Pathology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Armais A. Kamalov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Medical Research and Education Center of Lomonosov Moscow State University; Head of the Department of Urology and Andrology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0000-0003-4251-7545>

Valery K. Karpov – Cand. Sci. (Med.), Urologist, Urology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31; Associate Professor, Department of Urology and Andrology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0000-0001-7644-4263>

Nikolay K. Shakhpazyan – Cand. Sci. (Med.), Head of the Group of Molecular Biology and Genetics with Functions of Biometrics, Biomedicine and Biomedical Statistics, Reference Centre for Infectious and Viral Oncopathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Clinical Laboratory Diagnostics Physician, Pathology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0003-3386-7746>

Omar A. Osmanov – Urologist, Urology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31; Graduate Student, Department of Urology and Andrology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0000-0003-1453-9771>

Valentina V. Pechnikova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Pathologist, Pathology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0001-5896-4556>

Анализ применения современных гистологических критериев диагностики болезни Крона и язвенного колита на биопсийном материале

Х.М. Ахриева¹, А.Б. Казумова², Н.В. Пачуашвили^{2,3}, Е.А. Коган², А.С. Тертычный²

¹ ФГБОУ ВО Ингушский государственный университет, Магас, Республика Ингушетия, Россия

² ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

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

Резюме. Введение. Гистологическое исследование биоптатов тонкой и толстой кишки играет ключевую роль в постановке диагноза при болезни Крона и язвенном колите. Цель исследования – анализ современных гистологических критериев диагностики при данных заболеваниях.

Материалы и методы. В исследование включены 93 пациента: 35 с болезнью Крона и 58 с язвенным колитом. 56 пациентов были мужского пола, 37 женского. Проанализированы параметры, указанные в описаниях и гистологических заключениях. Пересмотрены биоптаты с целью уточнения дополнительных характеристик.

Результаты. Аномалии крипт обнаружены в 77,6% случаев язвенного колита, при болезни Крона – в 34,3% случаев. При язвенном колите ворсинчатая поверхность присутствовала в 58,6% случаев, при болезни Крона в 28,6% ($p=0,006$). Метаплазия клеток Панета выявлена в пяти случаях язвенного колита и одном случае болезни Крона ($p=0,404$). Снижение содержания муцина отмечалось в 68,9% случаев язвенного колита и в 5,7% болезни Крона ($p<0,001$); базальный плазмцитоз – в 75,9% случаев язвенного колита и 68,6% болезни Крона. Тяжелое, диффузное, трансмукозное увеличение клеток собственной пластинки отмечено в 91,4% случаев язвенного колита и 14,3% болезни Крона. Очаговое воспаление – в 85,7% случаев болезни Крона и 8,6% язвенного колита ($p<0,001$). Псевдопилорическая метаплазия – в 31,4% случаев болезни Крона и 3,4% при язвенном колите ($p<0,001$). Эпителиодные гранулемы обнаружены в 22,9% случаев болезни Крона ($p<0,001$).

Заключение. Для постановки диагноза «язвенный колит» значимыми были следующие гистологические показатели: ветвление и деформация крипт, изменение поверхности слизистой оболочки, снижение содержания слизи и диффузный характер воспаления, для болезни Крона – очаговый характер воспаления, псевдопилорическая метаплазия и эпителиодные гранулемы. Окончательный диагноз может основываться только на совокупности выявленных признаков.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника, морфологическая диагностика

Для корреспонденции: Нано Владимировна Пачуашвили. E-mail: npachuashvili@bk.ru

Для цитирования: Ахриева Х.М., Казумова А.Б., Пачуашвили Н.В., Коган Е.А., Тертычный А.С. Анализ применения современных гистологических критериев диагностики болезни Крона и язвенного колита на биопсийном материале. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):25–32. DOI: 10.31088/СЕМ2025.14.3.25-32.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 15.01.2025. Получена после рецензирования 31.01.2025. Принята в печать 17.02.2025.

Analysis of implementing modern histological criteria for diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis using biopsies

Kh.M. Akhrieva¹, A.B. Kazumova², N.V. Pachuashvili^{2,3}, E.A. Kogan², A.S. Tertychnyy²

¹ Ingush State University, Magas, Republic of Ingushetia, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³ National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Histological examination of intestinal biopsies is crucial for diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis. This study aimed to analyze modern histological diagnostic criteria, their interpretation, and alignment with current concepts.

Materials and methods. The study included 93 patients: 35 with Crohn's disease, 58 with ulcerative colitis; 56 males, 37 females. Histological descriptions and reports were analyzed, followed by a biopsy review to clarify additional features.

Results. Crypt abnormalities were detected in 77.6% of ulcerative colitis cases compared to 34.3% of Crohn's disease cases. Villous surface changes were present in 58.6% of ulcerative colitis cases and 28.6% of Crohn's disease cases ($p=0.006$). Paneth cell metaplasia was identified in five ulcerative colitis cases and one Crohn's disease case ($p=0.404$). Mucin depletion occurred in 68.9% of ulcerative colitis cases, significantly more than in Crohn's disease cases (5.7%, $p<0.001$). Basal plasmacytosis was noted in 75.9% of ulcerative colitis cases and 68.6% of Crohn's disease cases. Severe, diffuse, and transmucosal cellular infiltration of the lamina propria was found in 91.4% of ulcerative colitis cases and 14.3% of Crohn's disease cases. In contrast, focal inflammation was more frequent in Crohn's disease (85.7%) than in ulcerative colitis (8.6%, $p<0.001$). Pseudopyloric metaplasia was detected in 31.4% of Crohn's disease cases and 3.4% of ulcerative colitis cases ($p<0.001$). Epithelioid granulomas were found exclusively in Crohn's disease (22.9%, $p<0.001$).

Conclusion. The statistically significant histological parameters for diagnosing ulcerative colitis were the following: crypt branching and distortion, alterations in the mucosal surface, reduced mucus content, and diffuse inflammation. For Crohn's disease, the significant features included focal inflammation, pseudopyloric metaplasia, and epithelioid granulomas. The final diagnosis should be based on the combination of the identified features.

Keywords: ulcerative colitis, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, morphological diagnosis

Corresponding author: Nano V. Pachuashvili. E-mail: npachuashvili@bk.ru

For citation: Akhrieva Kh.M., Kazumova A.B., Pachuashvili N.V., Kogan E.A., Tertychny A.S. Analysis of implementing modern histological criteria for diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis using biopsies. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):25–32 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.25-32.

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

Received 15.01.2025. **Received in revised form** 31.01.2025. **Accepted** 17.02.2025.

Введение

Гистологический анализ эндоскопических биоптатов тонкой и толстой кишки играет ключевую роль в постановке окончательного диагноза при болезни Крона (БК) и язвенном колите (ЯК), а также в дифференциальной диагностике хронических идиопатических воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и других форм острого и хронического колита [1]. Тем не менее установление точного диагноза нередко представляет сложность. Инфекционные формы острого и хронического колита или илеита могут имитировать проявления ВЗК. Больше того, эндоскопические биоптаты, взятые на ранних стадиях заболевания или из участков с минимальными изменениями у пациентов с ВЗК, зачастую лишены характерных диагностических признаков [2].

Следует отметить, что эндоскопическая биопсия ограничивается исследованием слизистой оболочки и диагностические критерии, разработанные на основе хирургического материала, не всегда могут быть применены в полной мере. Несмотря на наличие новых рекомендаций Европейского общества по изучению болезни Крона и колита (ЕССО) по патогистологической диагностике ЯК и БК [3], диагностика ВЗК в практической работе остается затруднительной [4].

Целью исследования стал анализ практического применения современных гистологических критериев диагностики БК и ЯК на архивном биопсийном материале от пациентов с достоверно клинико-морфологически установленным диагнозом до начала лечения.

В современной клинической практике число таких пациентов уменьшается, что связано с тем, что большинство из них уже получают терапию или подверглись хирургическому лечению до выполнения биопсии [5].

Материалы и методы

В исследование включены 93 пациента с ВЗК, которые проходили лечение в клиниках Сеченовского университета в период с 2022 по 2024 год, из них у 35 была установлена БК, а у 58 ЯК. 56 пациентов были мужского пола, 37 женского. Среди пациентов с БК 26 были мужского пола, девять – женского, с ЯК – 32 мужского пола и 26 женского. Возраст пациентов с ЯК варьировал от 20 лет до 71 года, с БК – от 20 до 72 лет. Средний возраст пациентов с БК составил $36,7 \pm 11,9$ года, с ЯК – $41,0 \pm 13,7$ года. Во всех случаях диагноз был установлен на основании комплексного клинико-лабораторного, инструментального и морфологического методов исследований. В трудных случаях диагноз окончательно подтвержден консилиумами и эффективностью назначенного последующего лечения. У всех пациентов в ходе проведения илеоколоноскопии были получены множественные биоптаты подвздошной и толстой кишки в соответствии с международными рекомендациями [3].

На первом этапе исследования проанализированы параметры, указанные в заключениях (протоколах) прижизненного патологоанатомического исследования биопсийного материала. На втором этапе биоптаты

пересмотрены с целью уточнения дополнительных характеристик, которые могли быть полезны для диагностики. На основе анализа полученных данных составлен гистологический портрет ЯК и БК при первичной постановке диагноза.

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено локальным этическим комитетом Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (протокол № 02-23 от 26.01.2023).

Обработку биопсийного материала осуществляли по общепринятой методике. Полученный гистологический материал фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине, обрабатывали в аппарате гистологической проводки Leica ASP200 (Leica Biosystems, Германия), заливали в парафин. Далее готовые серийные гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Все гистологические препараты были оцифрованы на гистосканере Aperio AT (Leica, Германия) и размещены на цифровом сервере централизованного патологоанатомического отделения клинического центра Сеченовского университета с привязкой к медицинской карте стационарного больного каждого конкретного пациента. Это позволило в спорных случаях совместно и дистанционно пересматривать биоптаты и приходить к единой трактовке обнаруженных изменений после проведенных консультаций.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics версия 26.0 (США), проверку распределения на нормальность – применяя тест Шапиро–Уилкса. Для сравнения номинальных переменных в двух несвязанных совокупностях использовали критерий χ^2 , а при наличии ограничений для его использования – точный критерий Фишера. Критический уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты

Оцениваемые в биоптатах признаки (паттерны) можно условно разделить на архитектурные особенности, эпителиальные повреждения и метаплазию и характеристику воспаления. Архитектурные особенности включают ветвление крипт, их деформацию, атрофию крипт и неровности поверхности; эпителиальные повреждения и метаплазия – снижение содержания муцина и панетовскую метаплазию; особенности воспаления – повышенную клеточность (воспалительный инфильтрат) собственной пластинки и базальный плазмодитоз.

Аномалии крипт были обнаружены в большинстве случаев ЯК, составив 77,6% (рис. 1 А). В каждом исследуемом случае наблюдался по меньшей мере один из признаков данных изменений. При БК подобные изменения были зарегистрированы только в 34,3% случаев. Диффузные нарушения архитектуры крипт и уменьшение их количества или атрофия, как показывают многие

исследования, характерны для ЯК. Тем не менее эти признаки могут отсутствовать в биоптатах, взятых на начальной стадии заболевания. Предполагается, что минимальный срок для проявления этих признаков составляет не менее двух недель с момента начала заболевания. Деформация крипт и атрофия слизистой оболочки могут вернуться к норме или остаться без изменений на фоне лечения [6].

При ЯК ворсинчатая поверхность присутствовала в 58,6% случаев (по сравнению с 28,6% при БК, $p=0,006$). Патологические изменения обычно развиваются в период от 16 до 30 дней после появления первых симптомов.

Панетовская метаплазия (рис. 1 В) выявлена в пяти случаях ЯК и одном случае БК, что может быть полезно для диагностики. Несмотря на высокую прогностическую значимость этого признака, его чувствительность остается низкой ($p=0,404$), и он редко обнаруживается в биоптатах, полученных на ранних стадиях заболевания.

Снижение содержания слизи в эпителии, которое принято оценивать без применения морфометрических методов и специальных окрасок по уменьшению количества и размеров бокаловидных клеток, отмечалось в 68,9% случаев ЯК и лишь в 5,7% случаев БК ($p<0,001$). Этот признак хорошо коррелирует с активностью заболевания и на самом деле не является диагностическим. Сохранение высокого содержания бокаловидных клеток и даже увеличение их количества и размеров, определяемое как гиперкриния, в сочетании с активностью может способствовать диагностике БК.

Базальный плазмодитоз (рис. 1 С) в 75,9% случаев наблюдался в биоптатах, полученных от пациентов с ЯК, и в 68,6% от пациентов с БК. Этот признак редко встречается при колите, не связанном с ВЗК. Базальный плазмодитоз может уменьшаться и даже исчезать во время лечения.

Выраженная диффузная воспалительная инфильтрация собственной пластинки (рис. 1 Д) свидетельствовала в пользу диагноза ЯК в 91,4% случаев и была обнаружена у 14,3% пациентов с БК. Очаговое воспаление отмечено у 85,7% пациентов с БК и в 8,6% случаев у пациентов с ЯК ($p<0,001$).

Псевдопилорическая метаплазия (рис. 2 А) в случаях хронического илеита обнаружена у 31,4% пациентов с БК и лишь у 3,4% пациентов с ЯК ($p<0,001$).

Эпителиоидные гранулемы (рис. 2 В) локализовались в собственной пластинке слизистой оболочки, не были связаны с активным повреждением крипт и обнаружены как подтверждающий признак БК у 22,9% пациентов ($p<0,001$).

Диагностическая ценность выявления нейтрофильных лейкоцитов при ЯК ограничена, поскольку они также присутствуют при инфекционном колите и других формах данного заболевания (рис. 2 С). Это утверждение смело можно отнести и к крипт-абсцессам (рис. 2 Д), эрозиям и язвам. Такие изменения характеризуют воспалительно-деструктивные процессы, от-

ражают гистологическую активность, но не являются диагностическими, так как могут наблюдаться при тяжелых активных колитах различной этиологии [7].

Результаты проведенного исследования представлены в таблице.

Обсуждение

Микроскопическая картина ВЗК характеризуется сочетанием так называемых элементарных поражений – определенных гистологических признаков (паттернов).

Согласно последним рекомендациям, для них сформулированы конкретные определения [2]. Приводим практически дословный перевод гистологических критериев, сопроводив их комментариями и ссылками на микрофотографии, где они были представлены в материале проведенного исследования.

Архитектурные аномалии крипт. Ветвление крипт: две или более разветвленные (раздвоенные, вертикальные или горизонтальные) крипты в хорошо ориентированном срезе (рис. 1 А). Патогенез признака можно объяснить регенерацией после предыдущего повреж-

дения – разрушения крипты. Деформация структуры слизистой оболочки: нарушения размера крипт (переменный диаметр), расстояния, ориентации (потеря параллельности) и формы (в том числе ветвящийся и кистозный аспект), включая отделение от подлежащей мышечной пластинки слизистой оболочки. Атрофия слизистой оболочки: атрофия крипт – сниженная плотность крипт: сочетание уменьшенных крипт (утрата крипт – обычно увеличение расстояния более чем на один диаметр между ними) и общее увеличение расстояния между криптами и мышечной пластинкой слизистой оболочки. Патогенез авторы рекомендаций объясняют следующим образом: если все клетки крипт погибают, крипты репродуктивно стерилизуются и исчезают (экспериментально в течение 48 часов). Однако если одна или несколько клоногенных клеток (вероятно, имеются ввиду стволовые клетки крипт, располагающиеся в их основании) выживают после действия повреждающего фактора, они быстро размножаются и регенерируют крипту (в течение 72–96 часов в эксперименте у животных), а затем ткань заживает путем клональной экспансии (фактически будучи производ-

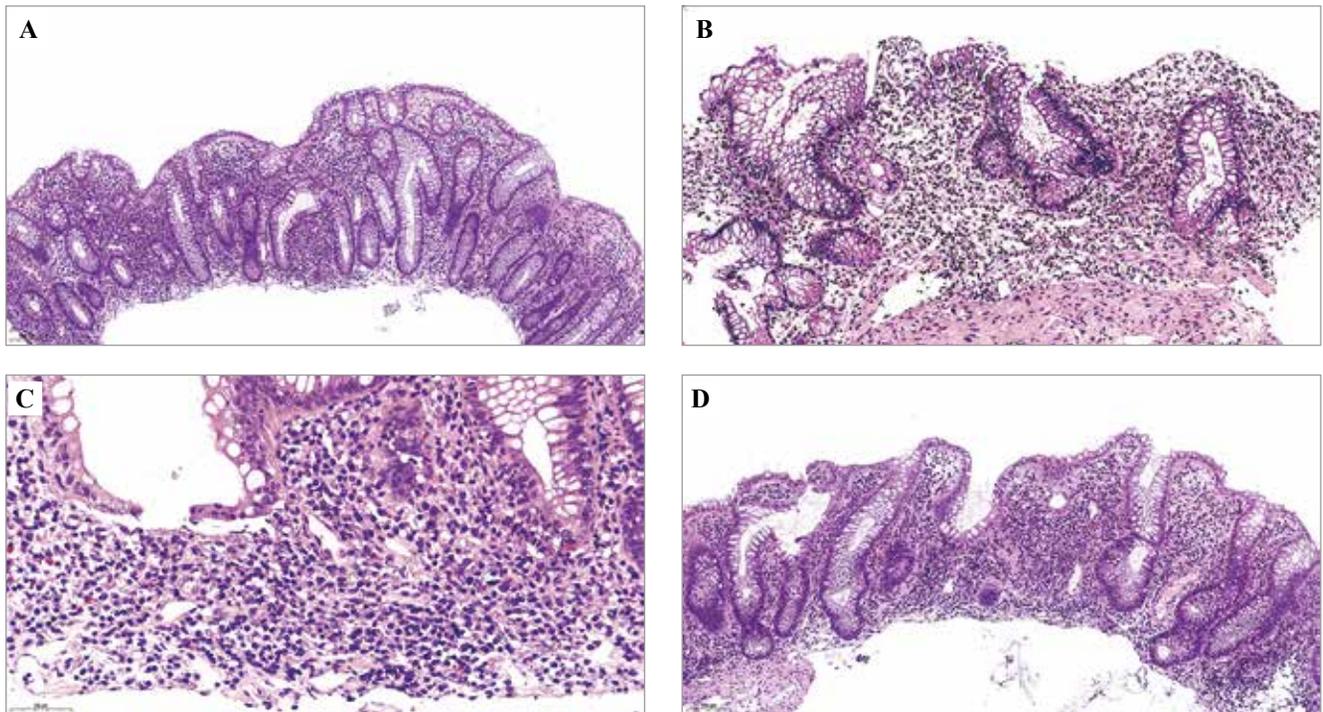


Рис. 1. Гистологические изменения при воспалительных заболеваниях кишечника.

А – архитектурные нарушения. Ветвление, деформация, почкование и атрофия крипт. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. В – повреждение и метаплазия эпителия. Появление в основании крипт клеток Панета (панетовская метаплазия). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. С – характеристика хронического воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки. Базальный плазмцитоз. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. D – характеристика хронического воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки. Диффузный характер распределения инфильтрата. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 160$

Fig. 1. Histological changes in inflammatory bowel diseases.

A – architectural abnormalities: branching, deformation, budding, and atrophy of crypts. H&E stain, $\times 100$. B – epithelial damage and metaplasia: appearance of Paneth cells at the crypt base (Paneth cell metaplasia). H&E stain, $\times 200$. C – characteristics of chronic inflammatory infiltrate in the lamina propria: basal plasmacytosis. H&E stain, $\times 400$. D – characteristics of chronic inflammatory infiltrate in the lamina propria: diffuse distribution of the infiltrate. H&E stain, $\times 160$

ной сохранившейся стволовой клетки). Количество крипт, которые выживают и регенерируют после цитотоксического воздействия, хорошо коррелирует с тяжестью симптомов на животных моделях. Неровность поверхности (синонимы – ворсинчатая поверхность, псевдоросинчатая поверхность): широкие устья крипт, придающие поверхности слизистой оболочки пальцевидный вид [8].

Повреждение и метаплазия эпителиальных клеток. Панетовская метаплазия (рис. 1 В): клетки Панета обычно крайне редко обнаруживаются в толстой кишке дистальнее селезеночного изгиба. Патогенез их появления связан с нарушением дифференцировки при регенерации. Снижение содержания слизи определяется как сокращение количества бокаловидных клеток, их размеров с уменьшением содержания слизи в цитоплазме [9]. Критерий давно известный, связанный с выра-

женными регенераторными изменениями, при которых эпителий крипт не успевает дифференцироваться в бокаловидные клетки ввиду увеличения скорости репликации и усиленной миграции к поверхности.

Особенности воспаления. Базальный плазмцитоз (субкрипталыные плазматические клетки, плазмцитоз с распространением в базальных отделах собственной пластинки слизистой оболочки) – скопление плазматических клеток в базальном слое собственной пластинки слизистой оболочки, отделяющего основание крипт от мышечной пластинки слизистой оболочки, определяют либо как наличие плазматических клеток вокруг этой области (на глубине около 1/5 собственной пластинки), либо как их расположение под криптами, рядом с ними или проникающими в мышечную пластинку слизистой оболочки (рис. 1 С). Поражение может быть очаговым или диффузным. Субкрипталыное расположение клеток

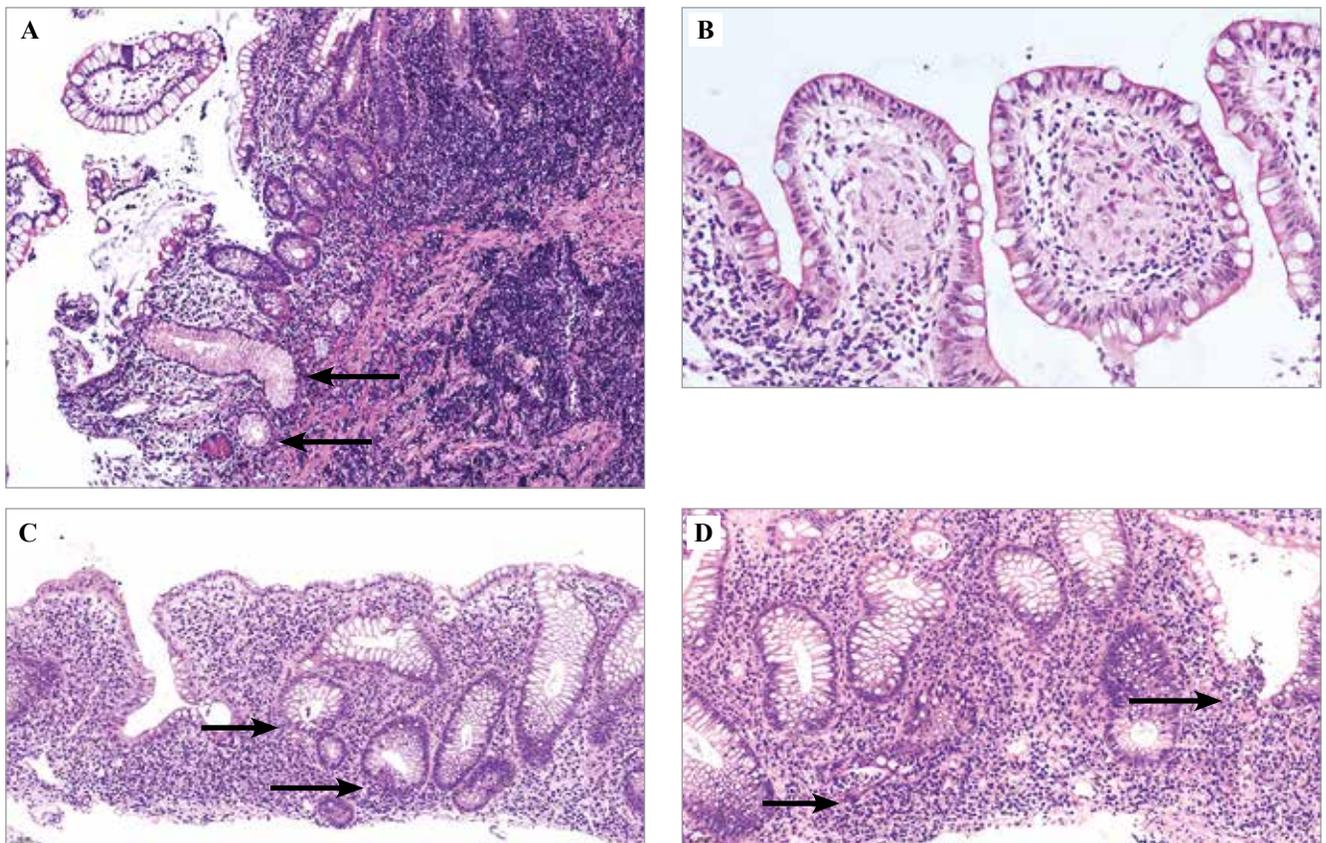


Рис. 2. Гистологические изменения при воспалительных заболеваниях кишечника.

А – очаг псевдопилорической метаплазии при хроническом илеите. Появление слизистых желез в базальных отделах собственной пластинки (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. В – типичные саркоидные гранулемы при болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. С – характеристика воспалительно-деструктивных процессов как проявление гистологической активности. Криптит (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 160$. D – характеристика воспалительно-деструктивных процессов как проявление гистологической активности. Формирование крипт-абсцессов. Разрушение крипт (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 2. Histological changes in inflammatory bowel diseases.

A – pseudopyloric metaplasia focus in chronic ileitis. Mucous glands are observed in the basal layer of the lamina propria (arrows). H&E stain, $\times 100$. B – typical sarcoid granulomas in Crohn's disease. H&E stain, $\times 400$. C – characteristics of inflammatory and destructive processes as manifestations of histological activity: cryptitis (arrows). H&E stain, $\times 160$. D – characteristics of inflammatory and destructive processes as manifestations of histological activity: formation of crypt abscesses and crypt destruction (arrows). H&E stain, $\times 200$

Частота выявляемости гистологических критериев диагностики БК и ЯК в биопсийном материале |
Frequency of histological criteria in biopsies of Crohn's disease and ulcerative colitis

Гистологический критерий Histological criterion	БК CD (n=35)		ЯК UC (n=58)		p
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
Ветвление крипт Crypt branching	10	28,6	34	58,6	0,006*
Деформация крипт Crypt deformation	12	34,3	45	77,6	<0,001*
Атрофия крипт Crypt atrophy	2	5,7	10	17,2	0,2
Изменение поверхности слизистой оболочки Alteration of mucosal surface	9	25,7	50	86,2	<0,001*
Снижение содержания слизи Mucin depletion	2	5,7	40	68,9	<0,001*
Панетовская метаплазия Paneth cell metaplasia	1	2,9	5	8,6	0,404
Очаговый характер воспаления Focal inflammation	30	85,7	5	8,6	<0,001*
Диффузный характер воспаления Diffuse inflammation	5	14,3	53	91,4	
Базальный плазмцитоз Basal plasmacytosis	24	68,6	44	75,9	0,476
Псевдопилорическая метаплазия Pyloric metaplasia	11	31,4	2	3,4	<0,001*
Эпителиоидные гранулемы Epithelioid granulomas	8	22,9	0	0	<0,001*
Крипитит Cryptitis	29	82,9	56	96,6	0,049*
Крипит-абсцессы Crypt abscesses	17	48,6	30	51,7	0,832
Эрозии Erosions	23	65,7	35	60,3	0,663
Язвы Ulcers	10	28,6	5	8,6	0,018*

БК – Болезнь Крона, ЯК – язвенный колит. * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$) | CD – Crohn's disease; UC – ulcerative colitis. * – differences are statistically significant ($p < 0,05$)

не всегда может быть обнаружено. Клеточность собственной пластинки: увеличение количества плазматических клеток, лимфоцитов, макрофагов (гистиоцитов) и эозинофилов является особенностью всех типов колоректального воспаления [10].

По распространению клеточный воспалительный инфильтрат собственной пластинки подразделяют на очаговый (фон с нормальной клеточностью и очаги с повышенной клеточностью) и диффузный (аномальный фон, демонстрирующий в целом одинаковое увеличение клеточности). Диффузное увеличение (рис. 1 D) может быть как поверхностным (увеличение количества клеток собственной пластинки, ограниченное поверхностной и средней третью собственной пластинки), так и трансмукозным (обычно максимальное в нижней трети). Распределение можно оценить в одном или нескольких биоптатах, взятых из того же сегмента кишки [11].

Псевдопилорическая метаплазия (пилорическая метаплазия, железы язвенно-ассоциированной клеточной линии) (рис. 2 А) включает железы, выстланные столбчатыми клетками, имеющими прозрачную или бледную цитоплазму с нейтральным муцином и овальными базально расположенными ядрами, что напоминает нормальные антральные и бруннеровы железы. Она связана с хроническим течением болезни, особенно в тонкой

кишке при БК. Псевдопилорическая метаплазия возникает в областях изъязвления и регенерации и может сохраняться долгое время после заживления [12].

Типичная гранулема при БК (рис. 2 В) определяется как скопление эпителиоидных гистиоцитов (моноцитов/макрофагальных клеток), контуры которых часто нечетко определены. Многоядерные гигантские клетки нехарактерны, и некроз обычно не определяется [13].

По мнению авторов рекомендаций, наличие нейтрофильных лейкоцитов в собственной пластинке вне капилляров считается аномальным, но точное их количество до конца не определено. Нейтрофилы могут вызывать крипитит, при котором наблюдается их проникновение через эпителиальную выстилку (рис. 2 С), а также разрушение крипт, включая возникновение крипит-абсцессов (рис. 2 D).

Для ЯК обязательно наличие диагностических паттернов, включающих признаки структурных нарушений, диффузного хронического воспаления и базального плазмцитоза [8]. Существуют дополнительные гистологические характеристики, такие как панетовская метаплазия и снижение содержания слизи в эпителии, которые могут сделать диагноз более обоснованным, хотя сами по себе не являются диагностическими. Для БК диагностическими признаками следует считать со-

четание поражения подвздошной кишки (хронический илеит), очаговый характер воспаления, наличие псевдопилорической метаплазии эпителия и гранулем [14]. Фактически перечисленные выше гистологические паттерны могут также служить дифференциально-диагностическими критериями между ЯК и БК.

Таким образом, исследование показало, что диагноз впервые установленного ЯК основывается на сочетании следующих признаков: базальный плазмоцитоз, определяемый как наличие плазматических клеток вокруг крипт или на глубине до 1/5 собственной пластинки (субкриптално), выраженный диффузный трансмукозный воспалительный инфильтрат собственной пластинки и распространенное нарушение архитектоники слизистой оболочки или крипт. Следует также подчеркнуть, что на фоне лечения ЯК воспаление может стать очаговым, а у детей с ЯК воспаление может быть первоначально неравномерно выраженным [15].

На основании результатов проведенного исследования можно сделать вывод, что наличие гранулем и очаговые (сегментарно-прерывистые) нарушения архитектоники крипт в сочетании с очаговым или неравномерно выраженным хроническим воспалением (определяется как преобладание мононуклеарных и плазматических клеток) представляют собой достоверные гистологические признаки и надежные маркеры для диагностики БК. Еще одной важной особенностью является сохранение муцина в очагах активного воспаления ($p < 0,001$).

Дифференциальная диагностика БК и ЯК остается сложной диагностической задачей, особенно при исследовании эндоскопических биопсий. Ряд патологических признаков встречается при обоих заболеваниях, различаясь преимущественно по степени выраженности [8]. Для повышения точности диагностики анализ биоптатов необходимо проводить с учетом характера и распространения воспалительного процесса.

Наличие воспалительных поражений в биоптатах подвздошной кишки способствует диагностике БК, особенно в сочетании с признаками хронического течения заболевания, такими как псевдопилорическая метаплазия. Однако этот признак не патогномоничен для БК, поскольку отражает процессы изъязвления и последующей регенерации; тем не менее БК является наиболее частой причиной таких изменений.

Результаты исследования показали, что правильный первоначальный диагноз БК или ЯК может быть поставлен с помощью классических гистологических критериев при изучении множественных биопсий из разных сегментов толстой и подвздошной кишки с учетом клинических данных и результатов илеоколоноскопии. В то же время точное число необходимых морфологических признаков для постановки диагноза не установлено. Правильный диагноз ЯК достигается примерно в 75% случаев при наличии двух или трех из четырех признаков – выраженного нарушения архитектоники крипт, значительного снижения их

плотности, ворсинчатой поверхности и выраженного диффузного трансмукозного воспаления при отсутствии гранулем.

Заключение

Статистически значимыми для постановки диагноза язвенного колита явились следующие гистологические показатели: ветвление и деформация крипт, изменение поверхности слизистой оболочки, снижение содержания слизи и диффузный характер воспаления, а для болезни Крона – очаговый характер воспаления, псевдопилорическая метаплазия и эпителиоидные гранулемы. Важно подчеркнуть, что ни один из морфологических параметров не обладает самостоятельной диагностической значимостью и окончательный диагноз может основываться только на совокупности выявленных признаков.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Х.М. Ахриева, Е.А. Коган, А.С. Тертычный.
Сбор и обработка материала – А.Б. Казумова, Н.В. Пачуашвили.
Написание текста – Н.В. Пачуашвили, А.С. Тертычный.
Редактирование – Х.М. Ахриева, А.Б. Казумова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – K.M. Akhrieva, E.A. Kogan, A.S. Tertychny.
Collected the data and performed the analysis – A.B. Kazumova, N.V. Pachuashvili.
Wrote the paper – N.V. Pachuashvili, A.S. Tertychny.
Edited the manuscript – Kh.M. Akhrieva, A.B. Kazumova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Neri B, Mossa M, Scucchi L, Sena G, Palmieri G, Biancone L. Histological scores in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis*. 2021;22(1):9–22. DOI: 10.1111/1751-2980.12937.
2. Fabián O, Kamaradová K. Morphology of inflammatory bowel diseases (IBD). *Cesk Patol*. 2022;58(1):27–37. PMID: 35387455.
3. Gordon H, Biancone L, Fiorino G, Katsanos KH, Kopylov U, Al Sulais E et al. ECCO guidelines on inflammatory bowel disease and malignancies. *J Crohns Colitis*. 2023;17(6):827–54. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjac187.
4. Тертычный А.С., Ахриева Х.М., Маев И.В., Зайратьянц О.В., Селиванова Л.С. Проблемы диагностики гистологической ремиссии у больных с воспалительными заболеваниями кишечника. *Архив патологии*. 2017;79(3):3–9. DOI: 10.17116/patol20177933-9.
Tertychny AS, Akhrieva KhM, Maev IV, Zairatyants OV, Selivanova LS. Diagnostic problems of histological remission in patients with inflammatory bowel disease. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2017;79(3):3–9 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20177933-9.
5. Kotla NG, Rochev Y. IBD disease-modifying therapies: insights from emerging therapeutics. *Trends Mol Med*. 2023;29(3):241–53. DOI: 10.1016/j.molmed.2023.01.001.

6. Тертычный А.С., Ахриева Х.М., Коган Е.А., Зайратьянц О.В., Селиванова Л.С. Современные подходы в морфологической диагностике воспалительных заболеваний кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2022;32(2):73–84. DOI: 10.22416/1382-4376-2022-32-2-73-84.
Tertychnyy AS, Akhriyeva KhM, Kogan EA, Zayratyants OV, Selivanova LS. Modern approach in the morphological diagnosis of inflammatory bowel diseases. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2022;32(2):73–84 (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2022-32-2-73-84.
7. Ахриева Х.М., Тертычный А.С., Маев И.В., Зайратьянц О.В. Классификация и морфологическая диагностика язвенного колита и болезни Крона. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;3(23):4–15. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29946271> (получено 13.01.2025).
Akhrieva KhM, Tertychniy AS, Maev IV, Zayratyants OV. Classification and morphological diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Clinical and experimental morphology. 2017;3(23):4–15. Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29946271> (accessed 13.01.2025).
8. Feakins R, Borrhalo Nunes P, Driessen A, Gordon IO, Zidar N, Baldin P et al. Definitions of histological abnormalities in inflammatory bowel disease: an ECCO position paper. J Crohns Colitis. 2024;18(2):175–91. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjad142.
9. Musulen E, Gené M, Cuatrecasas M, Amat I, Veiga JA, Fernández-Aceñero MJ et al. Gastric metaplasia as a precursor of nonconventional dysplasia in inflammatory bowel disease. Hum Pathol. 2024;143:50–61. DOI: 10.1016/j.humpath.2023.11.011.
10. Kóvári B, Báthori Á, Friedman MS, Lauwers GY. Histologic diagnosis of inflammatory bowel diseases. Adv Anat Pathol. 2022;29(1):48–61. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000325.
11. Villanacci V, Reggiani-Bonetti L, Caprioli F, Saragoni L, Salviato T, Mescoli C et al. Histopathology of inflammatory bowel disease – position statement of the Pathologists of the Italian Group for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) and Italian Group of Gastrointestinal Pathologists (GIPAD-SIAPEC). Dig Liver Dis. 2020;52(3):262–7. DOI: 10.1016/j.dld.2019.11.005.
12. Li H, Arslan ME, Lee EC, Qualia CM, Mikula MW, Fu Z et al. Pyloric gland metaplasia: potential histologic predictor of severe pouch disease including Crohn's disease of the pouch in ulcerative colitis. Pathol Res Pract. 2021;220:153389. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153389.
13. Cui Y, Lu SY, Xu J, Peng YS, Miao Q, Wang XQ et al. Microscopic features of small bowel mucosa of patients with Crohn's disease. BMC Gastroenterol. 2019;19(1):232. DOI: 10.1186/s12876-019-1138-2.
14. Dolinger M, Torres J, Vermeire S. Crohn's disease. Lancet. 2024;403(10432):1177–91. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)02586-2.
15. Schofield JB, Haboubi N. Histopathological mimics of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2020;26(7):994–1009. DOI: 10.1093/ibd/izz232.

Информация об авторах

Хава Мусаевна Ахриева – кандидат медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой факультетской терапии медицинского факультета Ингушского государственного университета.

Аглая Борисовна Казумова – студентка 4-го курса Института стоматологии имени Е.В. Боровского Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Нано Владимировна Пачуашвили – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории эндокринной биофотоники НМИЦ эндокринологии.

Евгения Алтаровна Коган – доктор медицинских наук, профессор, руководитель референс-центра иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов исследования Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

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

Author information

Khava M. Akhrieva – Cand. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Intermediate Level Therapy, Medical Faculty, Ingush State University.

<https://orcid.org/0000-0003-4683-1953>

Aglaya B. Kazumova – 4th-year Student, E.V. Borovsky Institute of Dentistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0009-0003-6481-6017>

Nano V. Pachuashvili – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Endocrine Biophotonics, National Medical Research Center of Endocrinology.

<https://orcid.org/0000-0002-8136-0117>

Evgeniya A. Kogan – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Reference Center for Immunohistochemical and Molecular Genetic Research Methods, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-1107-3753>

Alexander S. Tertychnyy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Electron Microscopy and Immunohistochemistry, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

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

Сравнительная характеристика иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки при дивертикулярной болезни

А.К. Конюкова^{1,3}, Л.М. Михалева^{1,3,4}, С.Г. Шаповальянц^{2,3},
А.И. Михалев^{2,3}, К.В. Болихов², А.В. Шулаев³

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

² ФГАУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 имени академика Г.М. Савельевой Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Дивертикулярная болезнь толстой кишки является одним из наиболее распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта. У 75% людей с дивертикулярной болезнью она протекает бессимптомно. В то же время в 15% случаев могут возникнуть осложнения, требующие неотложного хирургического вмешательства, а в оставшихся 10% наблюдается хроническое рецидивирующее течение. В плановой хирургии уровень послеоперационной летальности составляет менее 2%, тогда как при экстренных вмешательствах этот показатель достигает уже 20%. Социальный аспект данной проблемы касается ухудшения качества жизни пациентов, большинство которых подвергается экстренным операциям с формированием колостомы. Таким образом, чрезвычайно важным является определение предикторов осложненного течения дивертикулярной болезни для своевременной диагностики, адекватной маршрутизации и эффективного лечения этой категории пациентов. Цель нашего исследования – оценка местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с разным течением дивертикулярной болезни для выявления особенностей иммунного ландшафта при осложненном течении.

Материалы и методы. Проведена оценка качественного состава местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки в операционном материале от 68 пациентов, перенесших левостороннюю гемиколэктомию.

Результаты. В исследовании показано, что количество CD4+, CD8+ и C138+ иммунных клеток различается во всех сравниваемых группах, а количество CD56+ и CD68+ клеток различно в группах с дивертикулярной болезнью и группе сравнения ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные демонстрируют значимые различия в качественном составе иммунокомпетентных клеток слизистой оболочки толстой кишки в группах пациентов с дивертикулярной болезнью и группе сравнения, что указывает на роль местного иммунитета в патогенезе развития осложненного течения дивертикулярной болезни.

Ключевые слова: дивертикулярная болезнь толстой кишки, осложненное течение, местный иммунитет, иммунный ландшафт

Для корреспонденции: Александра Константиновна Конюкова. E-mail: have.to.study@yandex.ru

Для цитирования: Конюкова А.К., Михалева Л.М., Шаповальянц С.Г., Михалев А.И., Болихов К.В., Шулаев А.В. Сравнительная характеристика иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки при дивертикулярной болезни. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):33–41. DOI: 10.31088/СЕМ2025.14.3.33-41.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 22.11.2024. Получена после рецензирования 09.01.2025. Принята в печать 17.02.2025.

Comparative analysis of the immune landscape of the colon mucosa in diverticular disease

A.K. Konyukova^{1,3}, L.M. Mikhaleva^{1,3,4}, S.G. Shapovalyants^{2,3},
A.I. Mikhalev^{2,3}, K.V. Bolikhov², A.V. Shulaev³

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Savelyeva City Clinical Hospital No. 31, Moscow, Russia

⁴ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Diverticular disease is one of the most common gastrointestinal diseases. It is asymptomatic in 75% of patients. In 15% of cases, complications may arise requiring emergency surgery, whereas in the remaining 10%, the disease is chronic. In elective surgery, postoperative mortality rate is less than 2%, while in emergency operations it reaches 20%. The disease affects the quality of life of patients, most of whom undergo emergency operations followed by colostomy formation. Thus, it is extremely important to determine predictors of complicated diverticular disease for timely diagnosis, adequate routing, and effective treatment. We aimed to assess the local immunity of the colon mucosa in patients with diverticular disease of different courses and to identify the features of the immune landscape in complicated diverticular disease.

Materials and methods. We assessed the qualitative composition of the mucosal immune system in surgical samples from 68 patients who underwent left hemicolectomy.

Results. The number of CD4+, CD8+, and C138+ immune cells differed in all compared groups, and the number of CD56+ and CD68+ cells differed in groups with and without diverticular disease ($p < 0.05$).

Conclusion. The data demonstrate significant differences in the qualitative composition of immunocompetent cells of the colon mucosa in patients with and without diverticular disease, which indicates the role of local immunity in the pathogenesis of complicated diverticular disease.

Keywords: diverticular disease, complicated course, local immunity, immune landscape

Corresponding author: Alexandra K. Konyukova. E-mail: have.to.study@yandex.ru

For citation: Konyukova A.K., Mikhaleva L.M., Shapovalyants S.G., Mikhalev A.I., Bolikhov K.V., Shulaev A.V. Comparative analysis of the immune landscape of the colon mucosa in diverticular disease. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):33–41 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.33-41.

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

Received 22.11.2024. Received in revised form 09.01.2025. Accepted 17.02.2025.

Введение

Дивертикулярная болезнь толстой кишки (ДБТК) – распространенная патология пищеварительной системы, особенно в России, странах Европы и Северной Америки. Примерно 10% населения в возрастной группе от 40 до 49 лет страдает от этой болезни, а среди людей старше 70 лет показатель достигает 70% [1–3]. Почти у каждого третьего пациента ДБТК протекает с осложнениями, такими как острый дивертикулит, острый паракишечный инфильтрат, образование абсцесса и перфорация дивертикула, что может привести к развитию перитонита [4, 5]. Согласно зарубежным исследованиям, осложнения возникают примерно у одной из 20 женщин и одного из 30 мужчин в популяции [6]. Важно отметить, что число пациентов с первым в жизни острым эпизодом ДБТК, подвергшихся экстренному оперативному лечению, достигает 20% [7]. Летальность в случаях планового хирургического вмешательства составляет менее 2%, в то время как при экстренной операции она, по данным разных источников литературы, достигает 10–45% [8–11].

Проблема социально значима, так как экстренное хирургическое вмешательство зачастую завершается формированием колостомы [8, 12]. Важно отметить, что почти половина пациентов, перенесших экстренное хирургическое вмешательство, остается носителями колостомы. Причиной тому в 30% наблюдений является отказ пациентов от повторного хирургического вмешательства из-за нежелания подвергаться риску во время операции, а в 70% случаев отягощенный соматический статус и коморбидность [13].

Не менее важен и экономический аспект лечения болезни и ее осложнений. Согласно данным национальной статистики западных стран, с каждым годом затраты на стационарное лечение ДБТК увеличиваются, в частности в США с 1997 по 2015 год сумма, выделенная на лечение пациентов с ДБТК, выросла более чем 2 раза [14].

В развитых странах Запады показатели осложненной формы ДБТК каждый год стабильно увеличиваются. Это негативно сказывается на качестве жизни пациентов с данной нозологией и вызывает серьез-

ные проблемы в диагностике, маршрутизации и лечении [15, 16].

Таким образом, важным междисциплинарным вопросом в настоящее время является создание комплекса предикторов высокого риска развития гнойных осложнений ДБТК, что позволит выполнять плановые хирургические вмешательства с целью снижения числа экстренных хирургических операций с худшим прогнозом для пациентов как в плане их здоровья, так и качества жизни.

Материалы и методы

В исследовании ретроспективно проанализированы 68 клинических наблюдений: пациенты (26 мужчин и 42 женщины) в возрасте от 27 до 94 лет (Me=60 [51; 72,5]) с последовательно выполненными левосторонними гемиколэктомиями (n=47) и резекциями сигмовидной кишки (n=21).

Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено этическим комитетом РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (протокол № 3 от 23.03.2023).

Проанализированные клинические наблюдения были разделены на три группы: осложненное течение ДБТК (ОДБТК) (37), неосложненное течение ДБТК (НДБТК) (19) и случаи без дивертикулов толстой кишки (12). Мы оценивали пол и возраст пациентов, состав иммунокомпетентных клеток слизистой оболочки толстой кишки.

Патологоанатомическое исследование полученного биопсийного и операционного материала проводилось по стандартной методике. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина и после гистологической проводки в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 300 (Leica Microsystems, Германия) заливали в парафин на станции Leica EG 1150 (Leica Microsystems, Германия). Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином в автоматической станции Leica ST 5010 (Leica Microsystems, Германия). Микроскопическое исследование осуществляли на тринокулярном микроскопе Leica DMLB (Leica Microsystems, Германия, окуляры $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$) с использованием цифровой камеры Leica DFC 420 (Leica Microsystems, Германия). Захват изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica Application SuiteX (LASX; Leica Microsystems, Германия).

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли, используя иммуностейнеры Leica Bond-maX (Германия), Roche Ventana BenchMark Ultra (США) при помощи антител: Roche/Ventana CONFIRM™ anti-CD4 (SP35) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Ready-To-Use), Roche/Ventana CONFIRM™ anti-CD8 (SP57) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Ready-To-Use), Roche/Ventana CONFIRM™ anti-CD20 (L26)

Primary Antibody (Ready-To-Use), CELL MARQUE CD56 (MRQ-42) Rabbit Monoclonal Antibody (Ready-To-Use), Roche/Ventana CONFIRM™ anti-CD68 (KP-1) Primary Antibody (Ready-To-Use), CELL MARQUE CD138/syndecan-1 (B-A38) Mouse Monoclonal Antibody (Ready-To-Use). Были выявлены Т-хелперы (CD4+ лимфоциты), Т-киллеры (CD8+ лимфоциты), В-лимфоциты (CD20+ клетки), NK-клетки (CD56+ клетки), макрофаги (CD68+ клетки), плазмоциты (CD138+ клетки).

Подсчет иммунопозитивных клеток проводили в 10 полях зрения слизистой оболочки толстой кишки вне дивертикулов при $\times 400$ с последующим определением среднего арифметического (M) для каждого случая. Из подсчета были исключены поля зрения вблизи лимфоидных фолликулов подслизистой оболочки толстой кишки и вблизи дивертикулов с выраженным гнойным воспалением.

При статистической обработке данных применяли программное обеспечение IBM SPSS Statistics Base 23 (США), Jamovi (version 2.3, open-source). Для оценки нормальности распределения данных каждой группы использовали критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для описания тенденций величин с распределением, отличающимся от нормального, брали медиану и квартили (Me [Q1; Q3]). Для сравнения групп применялись U-критерий Манна–Уитни, H-критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим проведением апостериорных попарных сравнений Двасса–Стила–Кричлоу–Флигнера. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Медиана возраста пациентов, включенных в исследование, равнялась 60 годам (51; 72,5). В ходе исследования было выявлено, что ДБТК чаще встречалась у женщин, чем у мужчин, независимо от варианта течения (61 против 39%, соответственно).

Частота встречаемости осложнений ДБТК распределялась следующим образом: дивертикулит (n=7, 18,9%), абсцедирование (n=16, 43,2%), перфорация стенки дивертикула (n=14, 37,8%).

При оценке клеточного состава местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки было подсчитано количество иммунопозитивных клеток в поле зрения (табл. 1).

Выявлены тенденция увеличения числа CD4+, CD8+ и CD138+ клеток в ряду группа сравнения–ОДБТК–НДБТК (рис. 1, 2, табл. 2), а также рост количества CD56+ и CD68+ клеток в группах с ДБТК по сравнению с группой без дивертикулов (рис. 3, табл. 2).

При попарном сравнении групп были выявлены статистически значимые различия в количестве CD4+, CD8+ и CD138+ клеток во всех трех группах исследования, а различия в количестве CD56+ и CD68+ клеток установлены только в группах с дивертикулярной болезнью и без дивертикулов толстой кишки.

Сравнительная характеристика числа иммунокомпетентных клеток в поле зрения в сравниваемых группах |
Comparative characteristics of the number of immunocompetent cells in the field of view in the compared groups

Группа исследования Study group	ИГХ-маркер IHC marker Me (Q1; Q3)					
	CD4	CD8	CD20	CD56	CD68	CD138
НДБТК UDD	24 (25,5; 26,5)	36 (30,5; 36)	2 (2; 2)	8 (7,5; 8,5)	26 (25; 29)	39 (34; 41,5)
ОДБТК CDD	20 (12; 23)	29 (26; 34)	2 (2; 3)	8 (7; 8)	24 (22; 36)	22 (21; 23)
Группа сравнения Comparison group	7 (4,5; 9,5)	13 (13; 14,8)	2 (2; 2)	3 (3; 4,75)	17,5 (16,3; 18)	5 (4,25; 6,75)

НДБТК – неосложненная дивертикулярная болезнь толстой кишки. ОДБТК – осложненная дивертикулярная болезнь толстой кишки | UDD – uncomplicated diverticular disease. CDD – complicated diverticular disease

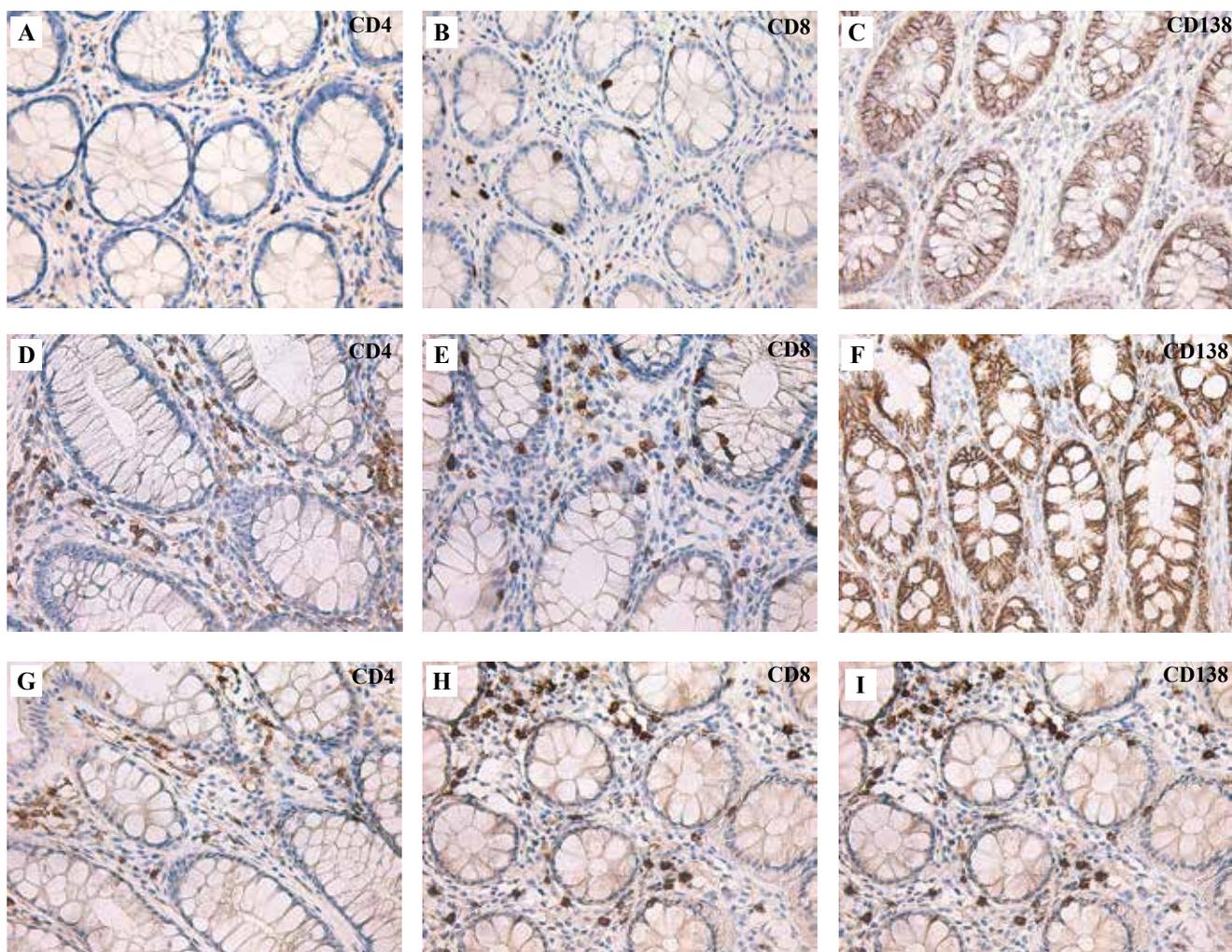


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с маркерами CD4 (A, D, G), CD8 (B, E, H) и CD138 (C, F, I) в слизистой оболочке толстой кишки без дивертикулов (A, B, C), с осложненным течением дивертикулярной болезни (D, E, F), с неосложненным течением дивертикулярной болезни (G, H, I). Докрашивание гематоксилином, $\times 400$

Fig. 1. Immunohistochemical reaction with markers CD4 (A, D, G), CD8 (B, E, H), and CD138 (C, F, I) in the the colon mucosa without diverticula (A, B, C), with complicated diverticular disease (D, E, F), and with uncomplicated diverticular disease (G, H, I). Hematoxylin counterstaining, $\times 400$

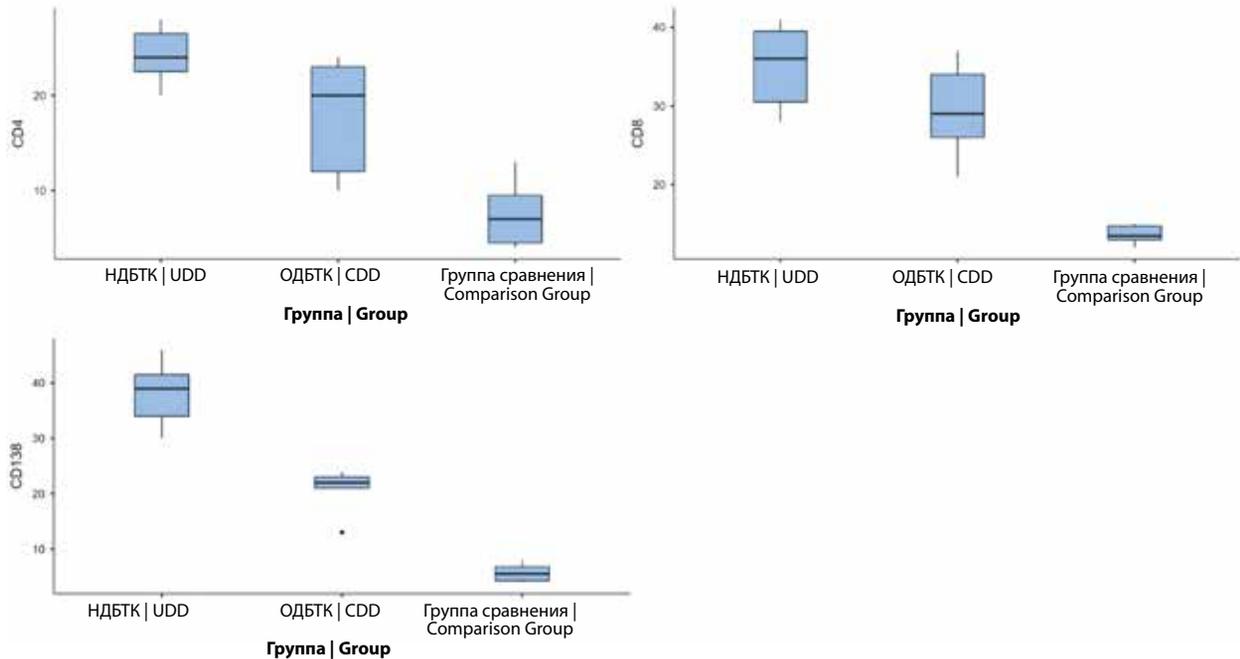


Рис. 2. Число CD4+, CD8+, CD138+ клеток в слизистой оболочке толстой кишки в сравниваемых группах
 Fig. 2. The number of CD4+, CD8+, and CD138+ cells in the colon mucosa in the compared groups

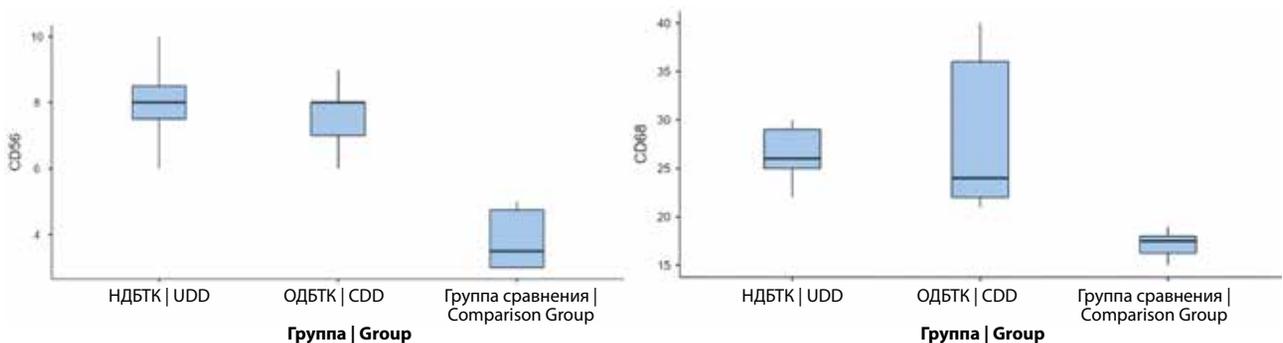


Рис. 3. Число C56+, CD68+ клеток в слизистой оболочке толстой кишки в сравниваемых группах
 Fig. 3. The number of C56+ and CD68+ cells in the colon mucosa in the compared groups

Статистически значимые различия в исследуемых группах при сравнении количества CD20+ клеток не обнаружены (табл. 2).

Обсуждение

Известно, что дивертикулярная болезнь сопровождается воспалительными изменениями слизистой оболочки толстой кишки [17, 18].

Нами было показано статистически значимое различие количества CD4+, CD8+ (Т-лимфоциты) и CD138+ (плазмоциты) иммунных клеток в слизистой оболочке толстой кишки как между группами с ДБТК и без дивертикулов, так и между группами с разным течением ДБТК. Различие в количестве плазмоцитов (CD138+ иммунные клетки) указывает на хронический характер воспаления при дивертикулярной болезни независимо от клинического варианта течения заболевания, что было отмечено в предшествующих исследованиях за-

рубежных авторов [19, 20]. В группе HDБТК продемонстрировано наибольшее количество плазмоцитов в поле зрения, что может быть связано с тем, что при длительном хроническом течении ДБТК с периодически эпизодами дивертикулита без гнойных осложнений воспалительный процесс постепенно прогрессирует, в то время как в группе с ОДБТК у пациентов, как правило, при первом эпизоде дивертикулита развиваются гнойные осложнения, приводящие к хирургическому вмешательству, за счет которого длительность фонового хронического воспаления уменьшается.

Продemonстрировано статистически значимое повышение CD4+ и CD8+ клеток (Т-лимфоциты) в ряду группа без дивертикулов—ОДБТК—HDБТК. Известно, что данные субпопуляции лимфоцитов участвуют в иммунном ответе на инфекционные агенты, при этом CD4+ лимфоциты регулируют дифференцировку CD8+ лимфоцитов при персистирующих инфекциях [21], что

Попарные сравнения количества иммунных клеток в группах (апостериорные сравнения методом Двасса–Стила–Кричлоу–Флигнера) | Pairwise comparisons of the number of immune cells in groups (post-hoc comparisons using the Dwass-Steel-Criehlow-Fligner method)

Попарное сравнение групп Pairwise comparison	ИГХ-маркер IHC marker	W-критерий Вилкоксона W-test	p-уровень значимости p-value
НДБТК и ОДБТК UDD and CDD	CD4	-3,88	0,017
	CD8	-3,41	0,042
	CD20	0,88	0,805
	CD56	-0,89	0,803
	CD68	-0,12	0,996
	CD138	-5,88	<0,001
НДБТК и группа сравнения UDD and comparison group	CD4	-4,70	0,003
	CD8	-4,70	0,003
	CD20	0	1,0
	CD56	-4,77	0,002
	CD68	2,22	0,002
	CD138	-4,70	0,003
ОДБТК и группа сравнения CDD and comparison group	CD4	-4,30	0,007
	CD8	-4,85	0,002
	CD20	-0,73	0,863
	CD56	-4,90	0,002
	CD68	1,37	0,002
	CD138	-4,87	0,002

указывает на важную роль состава микробиоты толстой кишки как инфекционного агента в развитии ДБТК в различных вариантах ее течения. При этом G. Varbara et al. в своем исследовании не выявили отличий в количестве Т-лимфоцитов в слизистой оболочке толстой кишки при ДБТК [22]. Расхождение данных в показателях местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки может быть связано как с индивидуальными особенностями состава микробиоты, так и с уровнем общего иммунитета в каждом отдельном клиническом случае.

Выявлено статистически значимое различие в количестве CD56+ и CD68+ клеток между группой без дивертикулов и группами с ДБТК. Тем не менее между группами с разным течением ДБТК статистически значимые различия в этом показателе не выявлены.

Подобные результаты по уровню макрофагов (CD68+ клеток) отметили и другие исследователи, подтверждая, что субпопуляции макрофагов у пациентов с дивертикулярной болезнью отличаются от таковых у пациентов группы сравнения, с преобладанием провоспалительных [23, 24].

Роль местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки в патогенезе развития гнойных осложнений ДБТК активно обсуждается отечественными и зарубежными исследователями. Многие из них связывают изменения иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки с нарушением ее микробиоты, которая начинает играть провоспалительную роль в патогенезе как дивертикулярной болезни, так и других заболеваний, в которых воспаление участвует в патогенезе [25–27].

Изменения иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки при ДБТК являются одним из звеньев ее патогенеза и могут применяться в качестве диагностического критерия развития НДБТК и ОДБТК у пациентов с впервые выявленными дивертикулами толстой кишки. В предшествующих исследованиях нами были продемонстрированы статистически значимые изменения мышечной и нервной ткани стенки толстой кишки у пациентов с различным течением ДБТК [28–30]. Представленные морфологические изменения необходимо рассматривать в совокупности, а также с учетом дополнительных методов исследования пациентов для комплекса предикторов осложненного течения ДБТК.

Заключение

Изменения местного иммунитета слизистой оболочки толстой кишки являются основой патогенетических механизмов развития дивертикулярной болезни толстой кишки и разных вариантов ее течения. Принимая во внимание исследования с результатами, отличающимися от наших, необходимо отметить важность сопоставления иммунного ландшафта слизистой оболочки толстой кишки с состоянием микробиоты и анализами крови в каждом клиническом случае. Наши исследования направлены на комплексную оценку морфологических изменений стенки толстой кишки при дивертикулярной болезни. Это поможет сформулировать объективные морфологические критерии для патологоанатомов и хирургов, что позволит в будущем выявлять пациентов с высокой вероятностью развития гнойных осложнений дивертикулярной болезни. Полученные данные будут способствовать ранней диагностике осложненного течения дивертикулярной болезни при патоморфологическом исследовании биопсийного материала колонобиопсии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, С.Г. Шаповальянц, А.К. Конюкова.
Сбор и обработка материала – А.К. Конюкова, А.И. Михалев, К.В. Болихов, А.В. Шулаев.
Написание текста – А.К. Конюкова.
Редактирование – Л.М. Михалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, S.G. Shapovalyants, A.K. Konyukova.
Collected the data and performed the analysis – A.K. Konyukova, A.I. Mikhalev, K.V. Bolikhov, A.V. Shulaev.
Wrote the paper – A.K. Konyukova.
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Piscopo N, Ellul P.* Diverticular disease: a review on pathophysiology and recent evidence. *Ulster Med J.* 2020;89(2):83–8. PMID: 33093692.
2. *Eckmann JD, Shauka A.* Updates in the understanding and management of diverticular disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2022;38(1):48–54. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000791.
3. *Воронцов О.Ф., Толочик В.В., Михин И.В., Китаева А.В., Грэб К.* Дивертикулярная болезнь: от традиций к инновациям. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* 2020;4(76):92–95. DOI: 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-92-95.
Vorontsov OF, Tolochyk VV, Mikhin IV, Kitaeva AV, Graeb C. Diverticular disease: from tradition to innovation. *Journal of Volgograd State Medical University.* 2020;4(76):92–95 (In Russ.). DOI: 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-92-95.
4. *Tursi A, Scarpignato C, Strate LL, Lanas A, Kruis W, Lahat A et al.* Colonic diverticular disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2020; 6(1):20. DOI: 10.1038/s41572-020-0153-5.
5. *Ардатская М.Д., Подставкина И.С., Мордасова В.И., Коротких Н.Н., Гарушьян Г.В.* Ретроспективный анализ распространенности, особенностей течения, лечения и исходов дивертикулярной болезни по данным многопрофильного стационара. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2020;176(4):77–82. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-176-4-77-82.
Ardatskaya MD, Podstavkina IS, Mordasova VI, Korotkikh NN, Garushyan GV. Retrospective analysis of the prevalence, characteristics, therapy and outcomes of diverticular disease according to the data of a multidisciplinary hospital. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2020;176(4):77–82 (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-176-4-77-82.
6. *Lammert F, Lynen Jansen P, Lerch M.* Gastroenterology White Paper 2020/2021: Diseases of the gastrointestinal tract, liver and pancreas – present and future. Berlin, Boston: De Gruyter, 2019. 290 p. DOI: 10.1515/9783110642513.
7. *Khalil HA, Yoo J.* Colorectal emergencies: perforated diverticulitis (operative and nonoperative management). *J Gastrointest Surg.* 2014;18(4):865–8. DOI: 10.1007/s11605-013-2352-9.
8. *Humes DJ.* Changing epidemiology: does it increase our understanding? *Dig Dis.* 2012;30(1):6–11. DOI: 10.1159/000335692.
9. *Левчук А.Л., Абдуллаев Э.Г., Абдуллаев А.Э.* Диагностика острого дивертикулита толстой кишки и его осложнений. *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.* 2021;3(16):25–32. DOI: 10.25881/20728255_2021_16_3_25.
Levchuk AL, Abdullaev EG, Abdullaev AE. Diagnosis of acute diverticulitis of the colon and its complications in surgical practice. *Bulletin of the Pirogov National Medical & Surgical Center.* 2021;3(16):25–32 (In Russ.). DOI: 10.25881/20728255_2021_16_3_25.
10. *Cameron R, Walker MM, Thuresson M, Roelstraete B, Sköldb-berg F, Olén O et al.* Mortality risk increased in colonic diverticular disease: a nationwide cohort study. *Ann Epidemiol.* 2022;76:39–49. DOI: 10.1016/j.annepidem.2022.10.006.
11. *Swanson SM, Strate LL.* Acute colonic diverticulitis. *Ann Intern Med.* 2018;168(9):ITC65–80. DOI: 10.7326/AITC201805010.
12. *Coakley KM, Davis BR, Kasten KR.* Complicated diverticular disease. *Clin Colon Rectal Surg.* 2021;34(2):96–103. DOI: 10.1055/s-0040-1716701.

13. Hallam S, Mothe BS, Tirumulaju R. Hartmann's procedure, reversal and rate of stoma-free survival. *Ann R Coll Surg Engl*. 2018;100(4):301–7. DOI: 10.1308/rcsann.2018.0006.
14. Fialho A, Fialho A, Shuja A. Analysis of the epidemiological trends on inpatient diverticulosis admissions in the US: a longitudinal analysis from 1997–2018. *Cureus*. 2023;15(2):e34493. DOI: 10.7759/cureus.34493.
15. Peery AF, Shaukat A, Strate LL. AGA clinical practice update on medical management of colonic diverticulitis: expert review. *Gastroenterology*. 2021;160(3): 906–11.e.1. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.09.059.
16. Хаджи Исмаил И.А., Воробей А.В., Лагодич Н.А., Дыбов О.Г., Старостин А.М., Батурин И.К. Дивертикулярная болезнь ободочной кишки: патогенез, классификация и осложнения. *Медицинские новости*. 2020;6(309):25–29. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43122367> (получено 23.11.2024).
Hadi Ismail IA, Varabei AV, Lahodzich NA, Dybau AH, Starostin AM, Baturin IK. Diverticular disease of the colon: pathogenesis, classification and complications. *Meditinskije novosti*. 2020;6(309):25–29 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43122367> (accessed 23.11.2024).
17. Tursi A, Elisei W. Role of inflammation in the pathogenesis of diverticular disease. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:8328490. DOI: 10.1155/2019/8328490.
18. Calin, G, Abd El Aziz MA, Paolini L, Abdalla S, Rottoli M, Mari G et al. Symptomatic uncomplicated diverticular disease (SUDD): practical guidance and challenges for clinical management. *Clin Exp Gastroenterol*. 2023;16:29–43. DOI: 10.2147/CEG.S340929.
19. Strate LL, Morris AM. Epidemiology, pathophysiology, and treatment of diverticulitis. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1282–98.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.033.
20. Scaiola E, Colecchia A, Marasco G, Schiumerini R, Festi D. Pathophysiology and therapeutic strategies for symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Dig Dis Sci*. 2016;61(3):673–83. DOI: 10.1007/s10620-015-3925-0.
21. Zander R, Schauder D, Xin G, Nguyen C, Wu X, Zajac A et al. CD4+ T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8+ T cell subset that protects against chronic infection and cancer. *Immunity*. 2019;51(6):1028–42.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.10.009.
22. Barbara G, Scaiola E, Barbaro MR, Biagi E, Laghi L, Cremon C et al. Gut microbiota, metabolome and immune signatures in patients with uncomplicated diverticular disease. *Gut*. 2017;66(7):1252–61. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312377.
23. Schieffer KM, Emrich SM, Yochum GS, Koltun WA. CD163L1+CXCL10+ macrophages are enriched within colonic lamina propria of diverticulitis patients. *J Surg Res*. 2021;267:527–35. DOI: 10.1016/j.jss.2021.06.016.
24. von Rahden BH, Kircher S, Thiery S, Landmann D, Jurowich CF, Germer CT et al. Association of steroid use with complicated sigmoid diverticulitis: potential role of activated CD68+/CD163+ macrophages. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(6):759–68. DOI: 10.1007/s00423-011-0797-4.
25. Nasef NA, Mehta S. Role of inflammation in pathophysiology of colonic disease: an update. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):4748. DOI: 10.3390/ijms21134748.
26. Caër C, Wick MJ. Human intestinal mononuclear phagocytes in health and inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2020;11:410. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00410.
27. Kvasnovsky CL, Leong LEX, Choo JM, Abell GCJ, Papagrigoiriadis S, Bruce KD et al. Clinical and symptom scores are significantly correlated with fecal microbiota features in patients with symptomatic uncomplicated diverticular disease: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(1):107–12. DOI: 10.1097/MEG.0000000000000995.
28. Колюкова А.К., Михалева Л.М., Козлова М.А., Арешидзе Д.А., Печникова В.В., Шаповальянц С.Г. и др. Патологические изменения мышечной ткани в стенке толстой кишки при дивертикулярной болезни. *Архив патологии*. 2024;86(4):13–22. DOI: 10.17116/patol20248604113.
Konyukova AK, Mikhaleva LM, Kozlova MA, Areshidze DA, Pechnikova VV, Shapovalyants SG et al. Pathological changes in the muscular tissue of the colon in diverticular disease. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2024;86(4):13–22 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20248604113.
29. Колюкова А.К., Михалева Л.М., Козлова М.А., Арешидзе Д.А., Шаповальянц С.Г., Михалев А.И. и др. Патологические изменения нервных ганглиев толстой кишки при различных вариантах течения дивертикулярной болезни. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского*. 2024;12(3):23–31. DOI: 10.33029/2308-1198-2024-12-3-23-31.
Konyukova AK, Mikhaleva LM, Kozlova MA, Areshidze DA, Shapovalyants SG, Mikhalev AI et al. Pathological changes in the nerve ganglia of the colon in uncomplicated and complicated courses of diverticular disease. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal*. 2024;12(3):23–31 (In Russ.). DOI: 10.33029/2308-1198-2024-12-3-23-31.
30. Колюкова А.К., Шаповальянц С.Г., Михалев А.И., Болихов К.В., Шулаев А.В., Гутьрич Н.А. и др. Морфологические и генетические предикторы осложненного течения дивертикулеза толстой кишки. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2022;11(3):5–14. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.5-14.
Konyukova AK, Shapovalyants SG, Mikhalev AI, Bolikhov KV, Shulaev AV, Gutyrchik NA et al. Morphological and genetic predictors of the complicated course of colon diverticulosis. *Clinical and experimental morphology*. 2022;11(3):5–14 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.5-14.

Информация об авторах

Александра Константиновна Колюкова – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой, профессор кафедры патологической анатомии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Сергей Георгиевич Шаповальянц – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии № 2 РНИМУ им. Н.И. Пирогова, заведующий хирургическим отделением № 2 ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Александр Иванович Михалев – доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии № 2 РНИМУ им. Н.И. Пирогова, врач-хирург ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Кирилл Валерьевич Болихов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной хирургии № 2 РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Андрей Владимирович Шулаев – заведующий отделением онкологии, врач-хирург ГКБ № 31 им. акад. Г.М. Савельевой.

Author information

Alexandra K. Konyukova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Pathologist, Pathology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0001-5925-5196>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Head of the Pathology Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31; Professor, Department of Pathological Anatomy, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Sergey G. Shapovalyants – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Hospital Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research University; Head of the Surgery Department, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0003-2396-223X>

Alexander I. Mikhalev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Hospital Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research University; Surgeon, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0002-9463-8229>

Kirill V. Bolikhov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Hospital Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research University.
<https://orcid.org/0000-0002-9623-3962>

Andrey V. Shulaev – Head of the Oncology Department, Surgeon, Savelyeva City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0003-3922-6210>

Изучение продукции белков Ki67 и p53 при развитии веррукозной карциномы

Ю.О. Тигай¹, А.А. Ивина¹, И.И. Бабиченко^{1,2}, О.Ф. Рабинович²,
И.М. Рабинович^{2,3}, Д.Р. Фамилья Фриас¹

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

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

³ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Веррукозную карциному слизистой оболочки полости рта относят к высококодифференцированному плоскоклеточному раку. Гистологические особенности веррукозной карциномы включают гиперкератоз, гиперплазию эпителия и сохранение целостности базальной мембраны на фоне хронического воспаления в собственной пластинке слизистой оболочки. Развитие веррукозной карциномы, как правило, начинается с веррукозной гиперплазии, при которой отмечается схожая гистологическая картина. Для более точной постановки диагноза используют иммуногистохимический метод исследования. Маркер Ki67 применяют для изучения пролиферативной активности клеток. Нарушение апоптоза в опухолевых клетках исследуют при помощи белка p53 двух типов: дикого (WTp53) и мутантного (MTrp53). Цель исследования – оценить иммуногистохимическую реакцию на Ki67 и p53 при веррукозной гиперплазии и веррукозной карциноме.

Материалы и методы. Изучение веррукозной гиперплазии проводили, используя биоптаты слизистой оболочки полости рта, полученные от пациентов с предварительным клиническим диагнозом «лейкоплакия». Всего изучены 27 случаев: веррукозная гиперплазия – 18 (66,6%), веррукозная карцинома – девять (33,3%). Пролиферативную активность оценивали при помощи антител к белку Ki67. Для исследования реакции на p53 применяли два вида антител: Clone DO-7 для определения одновременно дикого и мутантного типа белка и Clone Y5 для определения только мутантного типа белка.

Результаты. Иммунореактивные клетки по белку WTp53 составили 19,40% (16,40; 21,10) при веррукозной гиперплазии и 26% (25,70; 27,10) при веррукозной карциноме. Также при веррукозной карциноме была отмечена более высокая интенсивность окрашивания ядер. При изучении белка MTrp53 в группе веррукозной гиперплазии показатели составили 5,10% (2,90; 5,60), а в группе веррукозной карциномы 28,10% (27,10; 29,90). Наличие единичных иммуноположительных клеток в группе веррукозной гиперплазии можно охарактеризовать как проявление начальных изменений генома и развитие неоплазии.

Заключение. Антитела к белку MTrp53 предлагается использовать при дифференциальной диагностике веррукозной гиперплазии и веррукозной карциномы, так как присутствие иммуноположительных клеток указывает на наличие мутаций в геноме эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта.

Ключевые слова: веррукозная карцинома, p53, MTrp53, WTp53

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

Для цитирования: Тигай Ю.О., Ивина А.А., Бабиченко И.И., Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Фамилья Фриас Д.Р. Изучение продукции белков Ki67 и p53 при развитии веррукозной карциномы. Клин. эксп. морфология. 2025;14(3):42–48. DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.42-48.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 25.11.2024. Получена после рецензирования 26.12.2024. Принята в печать 17.02.2025.

Ki-67 and p53 protein production in the development of verrucous carcinoma

Yu.O. Tigay¹, A.A. Ivina¹, I.I. Babichenko^{1,2}, O.F. Rabinovich²,
I.M. Rabinovich^{2,3}, D.R. Familia Frias¹

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

² National Medical Research Center "Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery", Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Oral verrucous carcinoma is classified as a well-differentiated squamous cell carcinoma. Histologically, it is characterized by hyperkeratosis, epithelial hyperplasia, preservation of basal membrane integrity, and chronic inflammation in the lamina propria of the mucosa. The development of ver-

rucous carcinoma typically begins with verrucous hyperplasia, which exhibits a histological pattern similar to that of verrucous carcinoma. For a more accurate diagnosis, immunohistochemical methods are used. The proliferative activity of cells is assessed using the Ki-67 marker. Alterations in tumor cell apoptosis are studied by examining the p53 protein in its two forms: wild-type (WTP53) and mutant-type (MTP53). The paper aimed to evaluate immunoreactive cells for Ki-67 and p53 proteins in verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma.

Materials and methods. To investigate verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma, we examined oral mucosal biopsy samples obtained from patients with a preliminary clinical diagnosis of leukoplakia. A total of 27 cases were analyzed, including 18 cases of verrucous hyperplasia (66.6%) and 9 cases of verrucous carcinoma (33.3%). Proliferative activity was assessed using anti-Ki-67 antibodies. For p53 analysis, two antibody clones were used: DO-7, which detects both wild- and mutant-type proteins, and Y5, which specifically detects the mutant form.

Results. Immunoreactive cells for WTP53 protein accounted for 19.4% (16.40; 21.10) in verrucous hyperplasia compared to 26.0% (25.70; 27.10) in verrucous carcinoma, with higher nuclear staining intensity observed in the latter. For MTP53 protein, the values were 5.1% (2.90; 5.60) in verrucous hyperplasia and 28.1% (27.10; 29.90) in verrucous carcinoma. The presence of isolated immunopositive cells in the verrucous hyperplasia group may be interpreted as early genomic alterations and the onset of neoplasia.

Conclusion. MTP53 protein can be used for the differential diagnosis of verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma, as the presence of immunopositive cells indicates genomic mutations in oral mucosal epithelial cells.

Keywords: verrucous carcinoma, p53, MTP53, WTP53

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

For citation: Tigay Yu.O., Ivina A.A., Babichenko I.I., Rabinovich O.F., Rabinovich I.M., Familia Frias D.R. Ki-67 and p53 protein production in the development of verrucous carcinoma. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):42–48 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.42-48.

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

Received 25.11.2024. **Received in revised form** 26.12.2024. **Accepted** 17.02.2025.

Введение

Веррукозную карциному (ВК) слизистой оболочки полости рта (СОПР) относят к высококодифференцированному варианту плоскоклеточного рака (ПР) СОПР. По данным P. Sihavong et al. [1], ВК составляет 2–16% случаев ПР СОПР. В отличие от плоскоклеточной карциномы ВК медленно растет, редко дает отдаленные метастазы и имеет более благоприятный прогноз после лечения.

Веррукозная гиперплазия (ВГ) СОПР относится к предраковым поражениям и может трансформироваться как в ВК, так и в инвазивный ПР [2]. Веррукозная гиперплазия и веррукозная карцинома имеют общие клинико-морфологические характеристики на фоне дисплазии эпителия. Эти два заболевания могут проявляться в виде безболезненного обширного налета или массы белого цвета с шероховатой поверхностью. В связи с этим только на основании клинических проявлений их отличить невозможно [3].

При гистологическом исследовании образцов с ВК и ВГ обнаруживаются гиперпластические изменения эпителия без нарушения целостности базальной мембраны, а также определяются гипер- или паракератоз. При ВК также могут отмечаться акантоз и хронический воспалительный процесс в собственной пластинке слизистой оболочки, поэтому для установления точного диагноза необходимо проводить дополнительные исследования. В рутинной практике для их дифференци-

альной диагностики применяют иммуногистохимический метод (ИГХ).

Для распознавания злокачественных опухолей при помощи метода ИГХ золотым стандартом является выявление активно пролиферирующих клеток. Для этого используют антитела к белку Ki67, который обнаруживается во время фаз клеточного цикла G1, S, G2 и M и при этом не визуализируется во время фазы G0 [4]. При изучении пролиферативной активности клеток при помощи антител к Ki67 определяется индекс пролиферативной активности, который может быть использован как для диагностики заболевания, так и для оценки его прогноза. Ki-67 применяют при изучении развития опухолевых и неопухолевых состояний матки, желудка, предстательной и молочной желез [5]. В более ранних исследованиях, описанных в отечественных и зарубежных источниках, отмечена повышенная пролиферация клеток при развитии злокачественного процесса [6].

Ген *TP53* – это супрессор опухолевых клеток, который кодирует белок p53. p53 обнаруживается в ядрах клеток и проявляется как дикий тип (WTP53) при повышенной пролиферации клеток и как мутантный тип (MTP53) при наличии мутаций в *TP53*. Активация данного белка происходит при высокой пролиферации клеток и нарушениях генома. Основной функцией WTP53 является остановка роста клеток либо активация апоптоза в делящихся клетках. Благодаря этому ограничива-

ются рост и деление потенциально малигнизированных клеток.

Мутации в гене *TP53* являются наиболее распространенными среди генетических изменений при онкологических заболеваниях и приводят к образованию и накоплению МТр53. По данным D. Sund et al. [7], его накопление обнаруживается более чем в 85% случаев рака. МТр53 способствует пролиферации, инвазии и метастазированию раковых клеток. При накоплении МТр53 не только происходит инициация онкогенеза, но и затрудняется проведение противоопухолевой терапии, что существенно влияет на прогноз развития заболевания [8]. В настоящее время известно о небольшом числе исследований с использованием различных клонов белка p53, проведенных одновременно при ВГ и ВК.

Цель работы – оценить ИГХ реакцию на Ki67 и p53 при ВГ и ВК.

Материалы и методы

Исследование проведено на архивном операционном и биопсийном материале лаборатории патологической анатомии Национального медицинского исследовательского центра «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» за период с 2021 по 2024 год. Были отобраны образцы, полученные в отделении заболеваний слизистой оболочки рта от пациентов с предварительным клиническим диагнозом «веррукозная лейкоплакия». Исследование одобрено этическим комитетом Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (протокол № 1 от 14.01.2025). Изучены парафиновые срезы СОПР 27 пациентов (16 женщин и 11 мужчин), средний возраст которых составил 65,4 года. При гистологическом исследовании были установлены два диагноза, на основании которых сформированы две группы: «веррукозная гиперплазия» – 18 случаев (66,6%) и «веррукозная карцинома» – девять случаев (33,3%).

Гистологическое и ИГХ исследование материала проводили согласно стандартному протоколу. Пролиферативную активность клеток изучали с использованием мышиных моноклональных антител к Ki67 (MM1, Diagnostic BioSystems, США), p53+ клетки определяли при помощи мышиных моноклональных антител к p53 Clone DO-7 (Novocastra, Великобритания). Данный маркер выявляет одновременно мутантный и дикий тип белка. Для определения экспрессии только мутантного белка применяли моноклональные кроличьи антитела к p53 CloneY5 (Epitomics, США). ИГХ исследование проводили по протоколу Quanto. Использовали реагенты UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific, США), включая полимерный конъюгат пероксидазы хрена (HRP). Исследование проводилось на установке Autostainer 360 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Визуализацию и фотофиксацию

вели с помощью микроскопа Axioplan 2 Imaging (Karl Zeiss, Германия) и камеры AxioCam ERc5s (Karl Zeiss, Германия).

Определили отношение количества иммуноположительных ядер клеток к общему числу ядер клеток, были изучены индекс пролиферации (Ki67) и оценено количество p53+ клеток в ростковом и шиповатом слоях эпителия по ИГХ реакции с использованием Clone DO-7 и CloneY5.

Статистическую обработку данных проводили в среде Windows 10 (IBM Corporation, США), используя SPSS Statistics 23 version (США). При помощи критерия Манна–Уитни между исследуемыми группами были выявлены статистически значимые различия при $p < 0,001$.

Результаты

Гистологическое исследование

При изучении ВГ отмечались утолщение всего слоя эпителия, а также пара- и гиперкератоз. В 11 случаях из 18 (61,1%) в собственной пластинке слизистой оболочки находили признаки хронического воспаления. Клетки базального слоя образовывали широкие эпителиальные выросты в собственную пластинку СОПР, целостность базальной мембраны сохранялась на всем протяжении. Атипичные клетки и патологические митозы не обнаружены. При гистологическом изучении ВК обнаруживали утолщенный эпителий, целостность базальной мембраны также не нарушалась. Во всех случаях наблюдались гиперкератоз и воспалительный инфильтрат в собственной пластинке слизистой оболочки, который состоял преимущественно из лимфоцитов. В верхних слоях эпителия клетки были хорошо дифференцированы, в нижней трети эпителиального слоя отмечались нарушение рядности клеток и патологические митозы, что послужило отличительным признаком от ВГ (рис. 1 А, В).

Иммуногистохимическое исследование

Пролиферативная активность клеток определялась во всех группах. При ВГ Ki-67+ клетки наблюдались в ростковом слое и единично в шиповатом. При ВК положительная реакция к данному белку была выше и хорошо проявлялась не только в ростковом слое СОПР, но и в шиповатом (рис. 2 А, В).

При исследовании белка p53 с клоном D-07 иммунореактивные клетки отмечались во всех группах и располагались в базальном слое, но не визуализировались в шиповатом. Окрашивание ядер клеток оценивалось как умеренное. В группе ВК отмечалось более интенсивное окрашивание, чем в группе ВГ, как в ростковом, так и в шиповатом слое эпителия (рис. 2 С, D).

В группе ВГ окрашивание ядер на белок p53 клоном Y5 определялось в единичных клетках базального слоя в 83,3% случаев (15 из 18), при ВК иммуноположительная реакция была более выражена в базальном слое

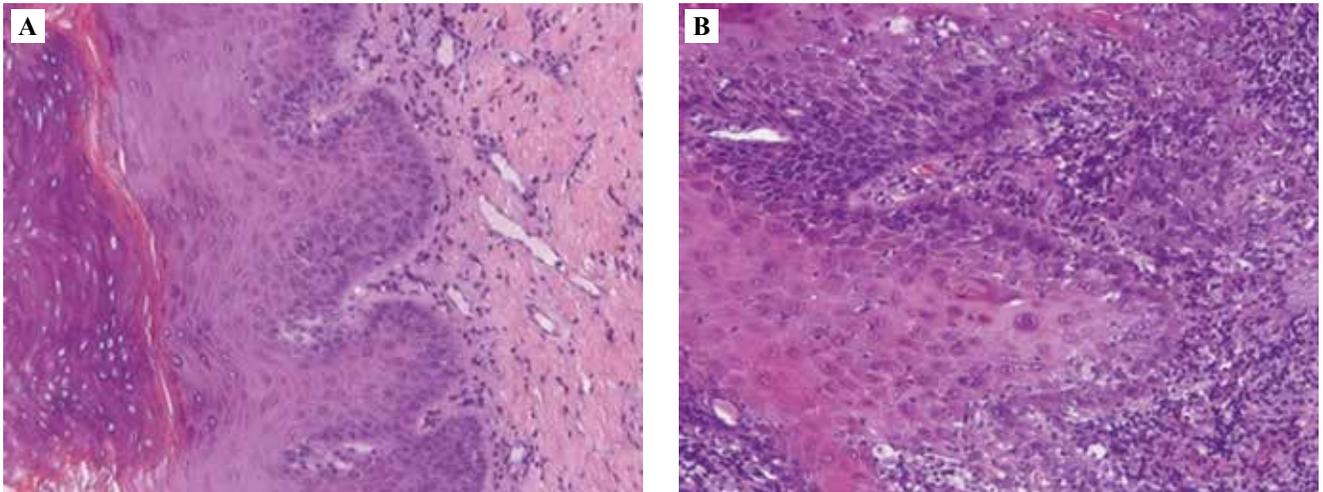


Рис. 1. А – веррукозная гиперплазия, В – веррукозная карцинома. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$
 Fig. 1. A – verrucous hyperplasia, B – verrucous carcinoma. H&E stain, $\times 200$

во всех случаях, а в 88% случаев окрашенные клетки затрагивали 2/3 толщины шиповатого слоя эпителия (рис. 2 Е, F).

Количественные результаты исследований представлены в таблице. В исследовании реакции на белок p53 дикого типа WTrp53 в ВГ показатель положительных клеток составил 19,40% (16,40; 21,10), в ВК 26% (25,70; 27,10), при этом в группе ВК интенсивность окрашивания ядер была выше. При изучении белка MTrp53 в группе ВГ показатели составляли 5,10% (2,90; 5,60)%, в группе ВК – 28,10% (27,10; 29,90). Наличие единичных иммуноположительных клеток в группе ВГ можно охарактеризовать как проявление начальных изменений генома и развитие неоплазии.

Обсуждение

Ki67 является маркером выбора для определения количества активно делящихся клеток, так как его ядерная локализация обнаруживается во всех фазах клеточного цикла, кроме G0 [9]. В неизменном эпителии пролиферативная активность клеток СОПР наблюдается в базальном и парабазальном слое [10]. В исследовании при ВК значение индекса пролиферативной активности клеток приближается к значению при ПР [11].

Отсутствие окрашенных на белок MTrp53 клеток в группе ВГ в некоторых случаях можно объяснить тем, что он часто стабилизирован и проявляется только в измененных клетках, тогда как WTrp53 (клон DO-7) регулируется и поддерживается на низком уровне в гомеостатических условиях и имеет быстрый период полураспада [7].

Наличие MTrp53+ клеток в группе ВГ даже в единичном количестве может свидетельствовать о проявлении начальных признаков мутаций в геноме клеток. Ранее было описано, что мутантный белок p53 способствует приобретению опухолевых свойств клетками, которые противодействуют защитной функции дикого типа данного белка [12]. A. Petitjean et al. изучили взаимосвязь мутаций в гене TP53 и развития опухолевого процесса [13]. Авторы J. Hu et al. также отмечают, что при появлении мутаций в этом гене происходит накопление белка MTrp53 более чем в 75% клеток и нарушается работа белка WTrp53 [14].

Ген-супрессор опухоли TP53 кодирует белок p53, участвующий во многих ключевых процессах в клетке, например регуляции клеточного цикла, метаболизме глюкозы, репарации ДНК, апоптозе и старении. Его активация может быть индуцирована разными сигналами стресса, такими как воспаление, нарушение метаболиз-

Таблица | Table

Сравнение исследуемых групп при помощи критерия Манна–Уитни |
 Comparison of the groups using the Mann–Whitney criterion

Группа Group	Me (Q1; Q3)		
	Ki-67 (%)	DO-7 (%)	Y5 (%)
Веррукозная гиперплазия Verrucous hyperplasia	20,10 (18,40; 23,20)	19,40 (16,40; 21,10)	5,10 (2,90; 5,60)
Веррукозная карцинома Verrucous carcinoma	29,90* (29,30; 30,30)	26,89* (25,70; 27,10)	28,10* (27,10; 29,90)

* – $p < 0,001$

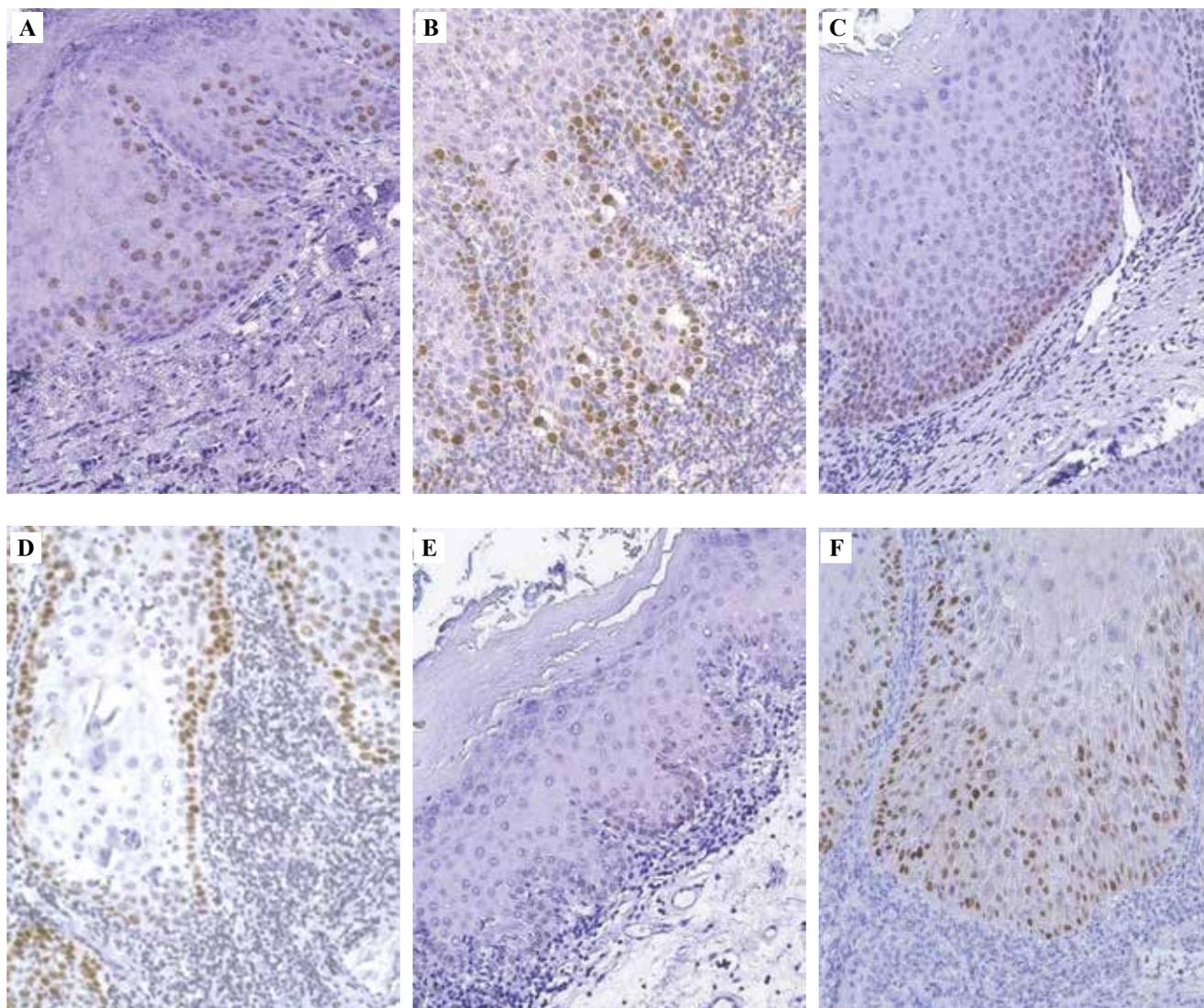


Рис. 2. А – веррукозная гиперплазия, В – веррукозная карцинома, иммуногистохимическая реакция на Ki67, С – веррукозная гиперплазия, D – веррукозная карцинома, реакция на p53 (Clone DO-7), Е – веррукозная гиперплазия, F – веррукозная карцинома, реакция на p53 (Clone Y5). Фоновое окрашивание гематоксилином Майера, $\times 200$

Fig. 2. А – verrucous hyperplasia, В – verrucous carcinoma, immunohistochemical reaction to Ki-67, С – verrucous hyperplasia, D – verrucous carcinoma, p53 (Clone DO-7), Е – verrucous hyperplasia, F – verrucous carcinoma, p53 (Clone Y5). Mayer's hematoxylin counterstain, $\times 200$

ма, влияние радиации и токсичных веществ, а также гипоксия и выработка активных форм кислорода [15]. Мутации в данном гене приводят к нарушению регуляции клеточного цикла, что может проявляться повышением пролиферации клеток. По данным К. Voskarides et al. [16], повреждения в гене *TP53* обнаруживаются примерно в 50% опухолей, а появление p53+ клеток является распространенным ранним явлением при малигнизации эпителия.

Выявление МТр53+ ядер клеток свидетельствует о наличии миссенс- и нонсенс-мутаций гена *TP53* [17]. В случае инактивации этого гена из-за мутаций утрачивается функция регуляции белка дикого типа, которая в физиологических условиях воздействует на

клетки после разных сигналов стресса и активирует сигнальный путь p53, что может запустить несколько программ транскрипции, включая остановку клеточного цикла, репарацию ДНК, старение и апоптоз. Все эти события могут привести к подавлению роста опухоли. Инактивация гена *TP53* способствует инвазии, пролиферации и выживанию поврежденных клеток, тем самым содействует прогрессированию рака и метастазированию [18].

Ж.К. Peltonen et al. [15] провели исследование по изучению накопления МТр53 при развитии неоплазии, где описали значение и частоту мутаций *TP53* при раке головы и шеи. Помимо нарушения клеточного цикла в виде апоптоза поврежденных клеток белок МТр53,

накапливаясь в клетках, повреждает ДНК через пост-трансляционные модификации.

Ранее К. Sawada et al. [19] было проведено изучение поломки гена *TP53* при дисплазии эпителия СОПР. Авторы использовали ИГХ метод для оценки p53+ клеток. Они также определяли количество делеций в локусе 17p13.1 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Данный метод был использован для изучения активности теломеразы и количественного выявления мутаций в хромосомном участке 3q26.2 в гене *TERC* (Telomerase RNA Component) с целью определения злокачественности веррукозной лейкоплакии [20].

По изучению распределения белка p53 существует целый ряд исследований при различных заболеваниях СОПР, таких как эритроплакия, дисплазия разной степени выраженности и плоскоклеточный рак, что подтверждает его диагностическое значение [21].

Заключение

Антитела к белку МТр53 (клон Y5) можно использовать при дифференциальной диагностике веррукозной гиперплазии и веррукозной карциномы. Иммуноположительная реакция в клетках указывает на наличие мутаций в геноме эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Ивина, И.И. Бабиченко.
Сбор и обработка материала – Ю.О. Тига́й, О.Ф. Рабинович, И.М. Рабинович, Д.Р. Фами́лья Фриас.
Написание текста – Ю.О. Тига́й.
Редактирование – И.И. Бабиченко, А.А. Ивина.

Authors contributions

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Sihavong P, Kitkumthorn N, Srimaneekarn N, Bumalee D, Lapthanasupkul P.* Differential expression of EZH2 and H3K27me3 in oral verrucous carcinoma and oral verrucous hyperplasia. *Head Neck Pathol.* 2021;15(2):408–15. DOI: 10.1007/s12105-020-01209-0.
2. *Chauhan K, Jassal V, Sara GK, Bansal V, Hatwal V.* Histopathological study of verrucous lesions and its mimics. *J Microsc Ultrastruct.* 2021;9(2):86–97. DOI: 10.4103/JMAU. JMAU_47_19.
3. *Richards R, Agarwal S.* Atypical squamous verrucous lesions of the oral cavity: challenges in interpretation of small incisional biopsies. *Head Neck Pathol.* 2023;17(3):607–17. DOI: 10.1007/s12105-023-01558-6.
4. *Takkem A, Barakat C, Zakaraia S, Zaid K, Najmeh J, Ayoub M et al.* Ki-67 prognostic value in different histological grades of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(11):3279–86. DOI: 10.31557/APJCP.2018.19.11.3279.
5. *Тележникова И.М., Жукова Л.Г., Кометова В.В., Хомерики С.Г., Карнаухов Н.С., Хатькова Е.И. и др.* Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(2):36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43. *Telezhnikova IM, Zhukova LG, Kometova VV, Khomeriki SG, Karnaukhov NS, Khatkova EI et al.* Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer using the global scoring. 2023;12(2):36–43 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
6. *Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang Y, Song Y, Zhang X et al.* Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2019;17(1):974–80. DOI: 10.3892/ol.2018.9647.
7. *Sundar D, Yu Y, Katiyar SP, Putri JF, Dhanjal JK, Wang J et al.* Wild type p53 function in p53^{Y220C} mutant harboring cells by treatment with Ashwagandha derived anticancer withanolides: bioinformatics and experimental evidence. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):103. DOI: 10.1186/s13046-019-1099-x.
8. *Lim DV, Woo WH, Lim JX, Loh XY, Soh HT, Lim SYA et al.* Targeting mutant-p53 for cancer treatment: are we there yet? *Curr Mol Pharmacol.* 2024;17(1):e140923221042. DOI: 10.2174/1874467217666230914090621.
9. *Mondal K, Mandal R, Sarkar BC.* Importance of Ki-67 labeling in oral leukoplakia with features of dysplasia and carcinomatous transformation: an observational study over 4 years. *South Asian J Cancer.* 2020;9(2):99–104. DOI: 10.1055/s-0040-1721212.
10. *Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A.* Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent.* 2013;4(1):7–12. DOI: 10.4103/0976-237X.111586.
11. *Kristofelc N, Zidar N, Strojjan P.* Oral verrucous carcinoma: a diagnostic and therapeutic challenge. *Radiol Oncol.* 2023;57(1):1–11. DOI:10.2478/raon-2023-0015.
12. *Brosh R, Rotter V.* When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):701–13. DOI: 10.1038/nrc2693.
13. *Petijean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28(6):622–9. DOI: 10.1002/humu.20495.
14. *Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B et al.* Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):157. DOI: 10.1186/s13045-021-01169-0.
15. *Peltonen JK, Helppi HM, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T, Vähäkangas KH.* p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. *Head Neck Oncol.* 2010;2:36. DOI: 10.1186/1758-3284-2-36.
16. *Voskarides K, Giannopoulou N.* The role of TP53 in adaptation and evolution. *Cells.* 2023;12(3):512. DOI: 10.3390/cells12030512.

17. Novack R, Zhang L, Hoang LN, Kadhim M, Ng TL, Poh CF et al. Abnormal p53 immunohistochemical patterns shed light on the aggressiveness of oral epithelial dysplasia. *Mod Pathol.* 2023;36(7):100153. DOI: 10.1016/j.modpat.2023.100153.
18. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013;15(1):2–8. DOI: 10.1038/ncb2641.
19. Sawada K, Momose S, Kawano R, Kohda M, Irié T, Mishima K et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 predict the mutational status of TP53 in oral epithelial dysplasia. *Mod Pathol.* 2022;35(2):177–85. DOI: 10.1038/s41379-021-00893-9.
20. Ивина А.А., Тигай Ю.О., Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Бабиченко И.И. Особенности молекулярно-генетической диагностики веррукозной лейкоплакии. *Стоматология.* 2023;102(4):6–10. DOI: 10.17116/stomat20231020416.
21. Ivina AA, Tigai YuO, Rabinovich OF, Rabinovich IM, Babichenko II. Features of molecular genetic diagnosis of verrucous leukoplakia. *Stomatology.* 2023;102(4):6–10 (In Russ.). DOI: 10.17116/stomat20231020416.
21. Yang H, Almadani N, Thompson EF, Tessier-Cloutier B, Chen J, Ho Jet et al. Classification of vulvar squamous cell carcinoma and precursor lesions by p16 and p53 immunohistochemistry: considerations, caveats, and an algorithmic approach. *Mod Pathol.* 2023;36(6):100145. DOI: 10.1016/j.modpat.2023.100145.

Информация об авторах

Юлия Олеговна Тигай – ассистент кафедры патологической анатомии медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Анастасия Анатольевна Ивина – доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Игорь Иванович Бабиченко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, заведующий лабораторией патологической анатомии НМИЦ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии».

Ольга Филипповна Рабинович – доктор медицинских наук, заведующая отделением патологии слизистой оболочки полости рта НМИЦ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии».

Илья Михайлович Рабинович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением терапевтической стоматологии НМИЦ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», заведующий кафедрой терапевтической стоматологии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Диана Росина Фамилия Фриас – ассистент кафедры патологической анатомии медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Author information

Yuliya O. Tigai – Assistant, Department of Anatomic Pathology, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6500-9220>

Anastasia A. Ivina – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Anatomic Pathology, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia. <https://orcid.org/0000-0001-8387-4413>

Igor I. Babichenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Anatomic Pathology, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; Head of the Laboratory of Anatomic Pathology, National Medical Research Center “Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery”. <https://orcid.org/0000-0001-5512-6813>

Olga F. Rabinovich – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathology of the Oral Mucosa, National Medical Research Center “Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery”. <https://orcid.org/0000-0002-1018-9017>

Ilya M. Rabinovich – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Therapeutic Dentistry, National Medical Research Center “Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery”; Head of the Department of Therapeutic Dentistry, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. <https://orcid.org/0000-0001-8539-814X>

Diana R. Familia Frias – Assistant, Department of Anatomic Pathology, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia. <https://orcid.org/0000-0001-7878-2901>

Гетерогенность содержания глюкокортикоидного рецептора в глиомах высокой степени злокачественности

Г.М. Казанская¹, А.М. Волков², Р.С. Киселев², Д.В. Костромская², С.Д. Аладьев¹,
Е.Э. Кливер^{2,3}, С.В. Айдагулова^{1,3}, Э.В. Григорьева^{1,4}, А.В. Строкотова^{1,4}

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Резюме. *Введение.* Морфологическая и молекулярно-генетическая гетерогенность глиальных опухолей считается одной из значимых характеристик, однако пока не находит широкого применения в клинической практике. В терапии опухолей мозга для снижения отека используется глюкокортикостероидный препарат дексаметазон, являющийся агонистом глюкокортикоидного рецептора. Содержание рецептора в глиомах высокой степени злокачественности, как и в интактной ткани головного мозга, изучено недостаточно. Тем не менее неоднородность содержания глюкокортикоидного рецептора может быть одним из параметров, определяющих гетерогенность глиом. Целью данной работы являлось изучение содержания глюкокортикоидного рецептора в глиомах высокой степени злокачественности Grade 4 у человека и в экспериментальных опухолях *in vivo*.

Материалы и методы. Ретроспективное исследование выполнено у 51 пациента, оперированного по поводу глиомы высокой степени злокачественности Grade 4. Группой сравнения служили образцы мозга 23 пациентов с сосудистыми мальформациями головного мозга. Для изучения содержания глюкокортикоидного рецептора в экспериментальной модели использовали мышей линии SCID, которым в головной мозг инокулировали клетки глиобластомы человека U87. Контролем служили интактные мыши линии SCID. Данные иммуногистохимического окрашивания с применением антител к глюкокортикоидному рецептору были использованы для расчета интегрального показателя содержания маркера.

Результаты. У пациентов с глиомой и в группе сравнения выделяются три подгруппы – с низким, умеренным и высоким содержанием глюкокортикоидного рецептора. В опухолевой ткани пациентов с глиомой преимущественно выявляется высокое содержание рецептора, тогда как в группе сравнения преобладают пациенты, характеризующиеся низким и умеренным содержанием рецептора в нервной ткани. По интегральному показателю содержания маркера между подгруппами всегда выявляются статистически значимые различия. В эксперименте *in vivo* опухоли всех мышей характеризуются исключительно высоким содержанием глюкокортикоидного рецептора, тогда как в контроле высокое и умеренное содержание белка наблюдается примерно в равных долях.

Заключение. Глиома высокой степени злокачественности Grade 4 гетерогенна по содержанию глюкокортикоидного рецептора. Трансформация нервной ткани, сопряженная с формированием глиомы высокой степени злокачественности, сопровождается увеличением содержания глюкокортикоидного рецептора по сравнению с нормой.

Ключевые слова: глиома, опухолевая гетерогенность, интактная ткань головного мозга, глюкокортикоидный рецептор

Для корреспонденции: Анастасия Владимировна Строкотова. E-mail: anastasia.strokotova@gmail.com

Для цитирования: Казанская Г.М., Волков А.М., Киселев Р.С., Костромская Д.В., Аладьев С.Д., Кливер Е.Э., Айдагулова С.В., Григорьева Э.В., Строкотова А.В. Гетерогенность содержания глюкокортикоидного рецептора в глиомах высокой степени злокачественности. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):49–57. DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.49-57.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (№ 125031203556-7) с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Статья поступила 07.11.2024. **Получена после рецензирования** 18.11.2024. **Принята в печать** 02.12.2024.

Heterogeneity of glucocorticoid receptor content in high-grade gliomas

G.M. Kazanskaya¹, A.M. Volkov², R.S. Kiselev², D.V. Kostromskaya²,
S.D. Aladev¹, E.E. Kliver^{2,3}, S.V. Aidagulova^{1,3}, E.V. Grigorieva^{1,4}, A.V. Strokotova^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Abstract. Introduction. Morphological, molecular and genetic heterogeneity of glial tumors is considered a significant feature and is not yet widely employed in clinical practice. To reduce edema in the treatment of brain tumors, dexamethasone is used, which is a glucocorticosteroid and a glucocorticoid receptor agonist. The content of the receptor in high-grade gliomas and intact brain tissue has not been sufficiently studied. However, heterogeneity of glucocorticoid receptor content may be one of the parameters determining the heterogeneity of these gliomas. This paper aimed to study the content of the glucocorticoid receptor in Grade 4 gliomas in humans and SCID mice.

Materials and methods. A retrospective study was performed on 51 patients operated on for Grade 4 glioma. The control group included samples from 23 patients with brain vascular malformations. The experimental group consisted of SCID mice that received human glioblastoma U87 cells. The control group was composed of intact SCID mice. We used the data of immunohistochemical staining using antibodies to the glucocorticoid receptor to calculate the integral score of marker content.

Results. In both groups of patients, we identified 3 subgroups, i.e., with low, moderate, and high content of the glucocorticoid receptor. High receptor content was most often observed in the group of patients with glioma, while low and moderate receptor content was detected in the patients from the control group. The integral score of receptor content always showed statistically significant differences between the subgroups. In the *in vivo* experiment, the U87 tumors were characterized by an extremely high content of the glucocorticoid receptor, while in the control group, high and moderate protein content was observed in approximately equal proportions.

Conclusion. Glioma Grade 4 is heterogeneous in the content of the glucocorticoid receptor. Transformation of the nervous tissue associated with the formation of high-grade glioma is accompanied by an increase in the expression of the glucocorticoid receptor.

Keywords: glioma, tumor heterogeneity, intact brain tissue, glucocorticoid receptor

Corresponding author: Anastasia V. Strokotova. E-mail: anastasia.strokotova@gmail.com

For citation: Kazanskaya G.M., Volkov A.M., Kiselev R.S., Kostromskaya D.V., Aladev S.D., Kliver E.E., Aidagulova S.V., Grigorieva E.V., Strokotova A.V. Heterogeneity of glucocorticoid receptor content in high-grade gliomas. *Clin. exp. morphology*. 2025;14(3):49–57 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.49-57.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (No. 125031203556-7), using the equipment of the Center for Collective Use “Proteomic Analysis” supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2021-691).

Received 07.11.2024. **Received in revised form** 18.11.2024. **Accepted** 02.12.2024.

Введение

Глиома высокой степени злокачественности Grade 4 (ГЛ Gr.4) – наиболее агрессивное заболевание головного мозга, которое характеризуется плохим прогнозом и медианой выживаемости 15 месяцев [1]. Несмотря на успехи, достигнутые в понимании биологии опухолевого процесса, лечение этого заболевания до сих пор остается нерешенной задачей. Одним из факторов, определяющих низкую эффективность лечения ГЛ Gr.4, может быть вариабельность индивидуальных опухолей и клеточного состава каждой конкретной опухоли [2].

В настоящее время известно, что для злокачественных глиом характерна морфологическая и молекулярно-генетическая гетерогенность. Молекулярно-генетическое тестирование с определением мутации в генах *IDH* сегодня является стандартом, необходимым для постановки патоморфологического диагноза в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы (ЦНС) Всемирной организации здравоохранения 2021 года [3]. Активно ведется поиск путей использования молекулярно-генетической гетерогенности злокачественных глиом в лечении пациентов. Так, проведены клинические исследования третьей фазы, подтверждающие увеличение выживаемости без прогрессирования при применении препарата ворасидениб (Servier Pharmaceuticals, США), направленного на мутантный белок IDH, по

кулярно-генетическая гетерогенность. Молекулярно-генетическое тестирование с определением мутации в генах *IDH* сегодня является стандартом, необходимым для постановки патоморфологического диагноза в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы (ЦНС) Всемирной организации здравоохранения 2021 года [3]. Активно ведется поиск путей использования молекулярно-генетической гетерогенности злокачественных глиом в лечении пациентов. Так, проведены клинические исследования третьей фазы, подтверждающие увеличение выживаемости без прогрессирования при применении препарата ворасидениб (Servier Pharmaceuticals, США), направленного на мутантный белок IDH, по

сравнению с плацебо при лечении пациентов с глиомами низкой степени злокачественности [4]. Другое исследование показало большую выживаемость без прогрессирования при комбинации препаратов дабрафениб (Novartis, Швейцария) и траметиниб (Novartis, Швейцария), направленных на мутантные белки BRAF и MEK, соответственно, по сравнению со стандартной химиотерапией у детей с глиомами низкой степени злокачественности [5].

Природу внутриопухолевой [6] и межопухолевой [7] гетерогенности первичных опухолей ЦНС активно изучают. Предполагается, что внутриопухолевая гетерогенность обусловлена генетически, эпигенетически и функционально разными клеточными субпопуляциями в пределах одной опухоли, что может способствовать формированию резистентности новообразования к проводимой радио- и химиотерапии [8, 9]. Многим новообразованиям, в том числе злокачественным глиомам, также свойственна иммунная гетерогенность, при которой выделяются субтипы в зависимости от содержания иммунных маркеров [10]. Наконец, свой вклад в гетерогенность первичных опухолей ЦНС помимо собственно опухолевых клеток способно вносить и их микроокружение [11]. Таким образом, злокачественные глиомы гетерогенны по многим параметрам.

Рост глиальных опухолей часто сопровождается развитием отека головного мозга. Для устранения данного состояния используют в том числе глюкокортикостероидные препараты, оказывающие свои эффекты через взаимодействие с глюкокортикоидным рецептором (ГР). Экспрессия последнего у пациентов с ГЛ Gr.4 вызывает особый интерес. Широко экспрессируясь в головном мозге, ГР вовлечен не только в функции ЦНС, но и во многие другие процессы, такие как адаптация к стрессу, модуляция иммунной системы [12]. Регуляция экспрессии генов при активации ГР зависит от физиологического и/или патологического состояния органа [13], включая онкологические заболевания, при которых взаимодействии ГР с глюкокортикостероидными препаратами может вызывать даже противоположные эффекты [14]. Вместе с тем анализу гетерогенности содержания ГР в глиомах к настоящему времени посвящены лишь отдельные работы, причем выполненные на ограниченной выборке пациентов [15]. Пока остается без внимания и тот факт, что в природе гетерогенности опухолей ЦНС немаловажную роль может играть исходная неоднородность содержания ГР в ткани мозга.

Цель исследования – изучить гетерогенность содержания ГР в ГЛ Gr.4 в экспериментальных опухолях *in vivo* и в ткани головного мозга, не измененной опухолевым процессом.

Материалы и методы

В рамках ретроспективного исследования случай–контроль были использованы диагностические биоптаты пациентов с гистологическим диагнозом ГЛ

Gr.4 (согласно классификации ICD-O [3]). В исследование вошел 51 пациент (24 мужчины и 27 женщин, средний возраст которых составил 55 лет – от 18 до 80 лет). Группу сравнения формировал материал головного мозга, полученный у 23 пациентов (11 мужчин и 12 женщин, средний возраст которых составил 40 лет – от 11 до 68 лет), оперированных по поводу сосудистых мальформаций. Патоморфологическое исследование биопсийного материала пациентов проводилось с помощью гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов диагностики. У 18% пациентов с глиомами методом полимеразной цепной реакции была выявлена мутация в гене *IDH1* (R132H) (астроцитомы Grade 4), у 82% пациентов установлен дикий тип (глиобластома Grade 4). Хирургическое лечение пациенты получали на базе Национального медицинского исследовательского центра имени академика Е.Н. Мешалкина в период с 2019 по 2023 год. В соответствии с Федеральным законом № 323-ФЗ от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие на проведение клинических исследований.

Материал фиксировали в 10% забуференном формалине с последующим изготовлением парафиновых блоков по стандартной методике. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (протокол № 5/2017 от 23.07.2017).

Для изучения гетерогенности содержания ГР в экспериментальных опухолях *in vivo* использовали мышшей линии SCID в возрасте 10 недель (ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск), которым ортотопически вводили опухолевые клетки глиобластомы U87. После начала ингаляционного наркоза, содержащего 1,5% изофлюрана, 5 мкл суспензии клеток U87 (500 тысяч клеток) вводили в подкорковые структуры головного мозга через отверстие в черепной коробке животного в районе bregma диаметром 3–4 мм [16]. Группу контроля формировали интактные мыши.

Эксперименты были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации согласно руководству по гуманному обращению с животными (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011). Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ (протокол № 6/2017 от 23.07.2017).

После иссечения левое полушарие головного мозга мышшей фиксировали в 10% забуференном формалине и заключали в парафин (BioVitrum, Россия). Коронарные срезы получали приблизительно на одном расстоянии ($5 \pm 0,5$ мм) от bregma.

У пациентов и животных с опухолью анализировали как собственно опухолевую ткань, так и околоопухолевую область. Околоопухолевой областью считали зоны без диффузного опухолевого роста и распространенного клеточного полиморфизма, когда в поле зрения количество атипичных клеток не превышало 1–2% при $\times 400$. У пациентов с сосудистыми мальформациями анализировали нервную ткань мозга в межсосудистой зоне. В нервной ткани головного мозга мышей, не измененной опухолевым процессом, анализу подвергали поля зрения, включающие молекулярный, наружный зернистый с зоной перехода в пирамидный слой коры, в пределах первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры и первичной соматосенсорной коры (S1HL, S1FL, S1BF и иногда S1DZ), начиная от центральной борозды по окружности полушария.

Для оценки содержания ГР на срезах проводили непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами против ГР-антигена (ab. 183127, Abscam, США) в разведении 1:1000. Для визуализации продуктов реакции применяли систему детекции (ab64264, Abscam, США). Демаскировку антигенов проводили с помощью буфера с pH 9 (Dewax and HIER Buffer H, Thermo Scientific, США). Срезы изучали при помощи микроскопа AxioScopeA1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 400 раз.

Для подсчета клеток, имеющих ядерную локализацию ГР (объектив $\times 40$), на каждом препарате анализировали не менее 5 неперекрывающихся полей зрения площадью 5000 μm^2 . Степень выраженности иммуногистохимической реакции оценивали по визуально-аналоговой шкале, используемой в клинической практике при исследовании ядерных маркеров опухолей головного мозга (American Society of Clinical Oncology (ASCO) / College of American Pathologists, CAP). Согласно данной системе, в каждом образце рассчитывали процент ядер клеток с различной интенсивностью окраски (от 1 до 3 баллов): +++ (3 балла) – высокое содержание, ++ (2 балла) – умеренное содержание, + (1 балл) – слабое содержание, (0 баллов) – белок отсутствует. На основании данных по распространенности и интенсивности сигнала для каждого образца также был определен интегральный показатель содержания ГР. Для его расчета процент ядер, имеющих различную интенсивность окраски (показатель распространенности сигнала), умножали на 3 балла, 2 балла и 1 балл, соответственно (то есть на показатель интенсивности сигнала), затем цифры, полученные для каждого образца, суммировали.

Интегральный показатель (ИП) = $[(\% \text{ на } 0) \times 0] + [(\% \text{ на } 1+) \times 1] + [(\% \text{ на } 2+) \times 2] + [(\% \text{ на } 3+) \times 3]$ [17].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы OriginPro 8.5 (OriginLab, США). Проверку соответствия выборок закону нормального распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Статистическую значимость различий определяли с использованием

теста Манна–Уитни. При попарном сравнении различия считали значимыми при $p < 0,05$, при сравнении трех групп вносилась поправка Бонферрони.

Результаты

У 57% пациентов с ГЛ Gr.4 в опухоли выявлялось высокое содержание ГР (значение ИП содержания ГР составляет 200–300), у 29% умеренное (значение ИП содержания ГР составляет 100–200), а у 14% слабое содержание ГР или белок отсутствовал (значение ИП содержания ГР составляет 0–100) (рис. 1 А, 2). При попарном сравнении содержания ГР между всеми подгруппами регистрировались статистически значимые отличия: низкий–умеренный ИП $p = 0,00024$, умеренный–высокий ИП $p = 0,000000076$, низкий–высокий ИП $p = 0,000053$ (рис. 1 В). Характерно, что во всех трех подгруппах присутствовали пациенты как с мутацией в гене *IDH1* (13–21%), так и с глиомами дикого типа (79–87%).

В околоопухолевой области у пациентов с ГЛ Gr.4 подгруппы с высоким, низким и средним содержанием рецептора были представлены практически в равных долях (рис. 1 А), и между ними также имелись попарные различия (низкий–умеренный ИП $p = 0,00577$, умеренный–высокий ИП $p = 0,00336$, низкий–высокий ИП $p = 0,00797$) (рис. 1 В). Высокое содержание рецептора в околоопухолевой области по сравнению с опухолью встречалось реже, таких пациентов было 33%. Напротив, низкое содержание рецептора в околоопухолевой области по сравнению с опухолью встречалось чаще (28%). В группе сравнения превалировали пациенты с умеренным содержанием ГР (48%), при этом доля пациентов с низким содержанием ГР становилась выше, чем у пациентов с ГЛ Gr.4 с сохранением значимых различий в показателях ИП между подгруппами (низкий–умеренный ИП $p = 0,00019$, умеренный–высокий ИП $p = 0,012$, низкий–высокий ИП $p = 0,016$) (рис. 1 В).

Результаты иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к ГР, демонстрирующие высокий, умеренный и низкий уровень ИП содержания маркера в клинических образцах, представлены на рисунке 2.

Таким образом, у пациентов с ГЛ Gr.4 в опухолевой ткани преобладало высокое содержание ГР, в околоопухолевой области все три уровня содержания (высокий, умеренный и низкий) регистрировались приблизительно с равной частотой, тогда как в ткани головного мозга, не измененной опухолевым процессом, выявлялось преимущественно умеренное содержание ГР.

В экспериментальной модели было показано, что у всех мышей линии SCID в перевитой опухоли выделялась только одна из трех подгрупп, которые регистрировались у пациентов (рис. 3 А, 4). В околоопухолевой области у животных высокое содержание ГР выявлялось значительно реже, и такая подгруппа составляла лишь 55%, при этом появлялась подгруп-

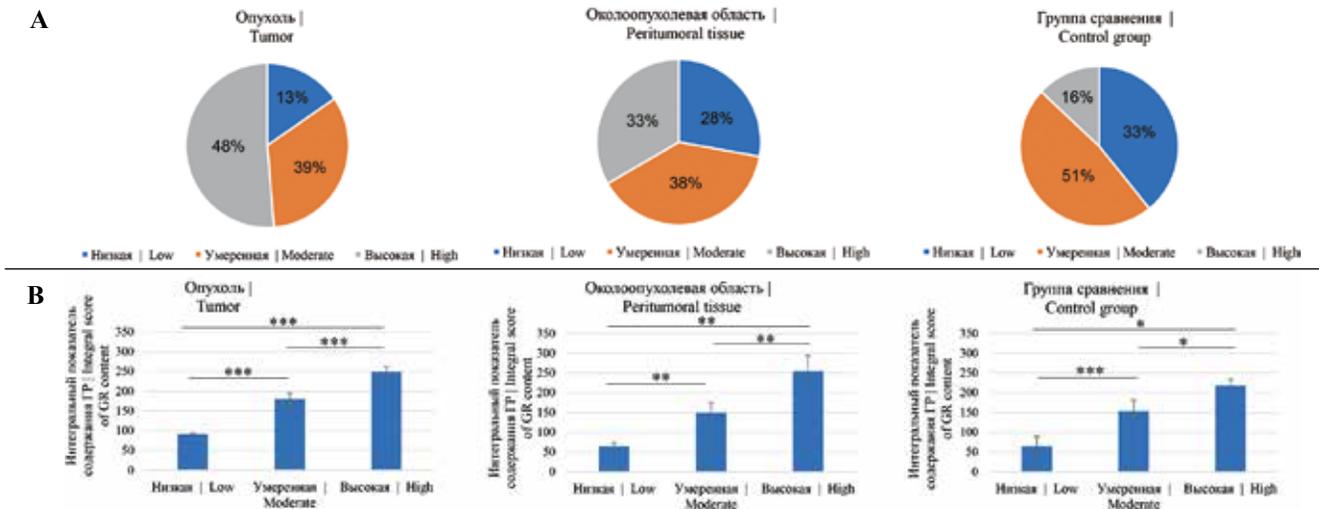


Рис. 1. Содержание ГР у пациентов с ГЛ Gr.4 и в группе сравнения. А – процентное распределение пациентов, имеющих высокое, умеренное и низкое содержание ГР в опухоли (n=51), околоопухолевой области (n=18) и группе сравнения (n=23). В – график с разбивкой пациентов на группы с ИП менее 100 (низкий), от 100 до 200 (умеренный) и от 200 до 300 (высокий) в опухоли (n=51), околоопухолевой ткани (n=18) и клиническом контроле (n=23)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия

Fig. 1. Glucocorticoid receptor content in patients with glioma Grade 4 and in the control group. A – the percentage of patients with high, moderate, and low glucocorticoid receptor content in the tumor tissues (n=51), peritumoral tissues (n=18), and the tissues from the control group (n=23). B – the division of patients into groups with integral score less than 100 (low), from 100 to 200 (moderate), and from 200 to 300 (high) in the tumor tissues (n=51), peritumoral tissues (n=18), and the tissues of the control group (n=23)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – statistically significant differences

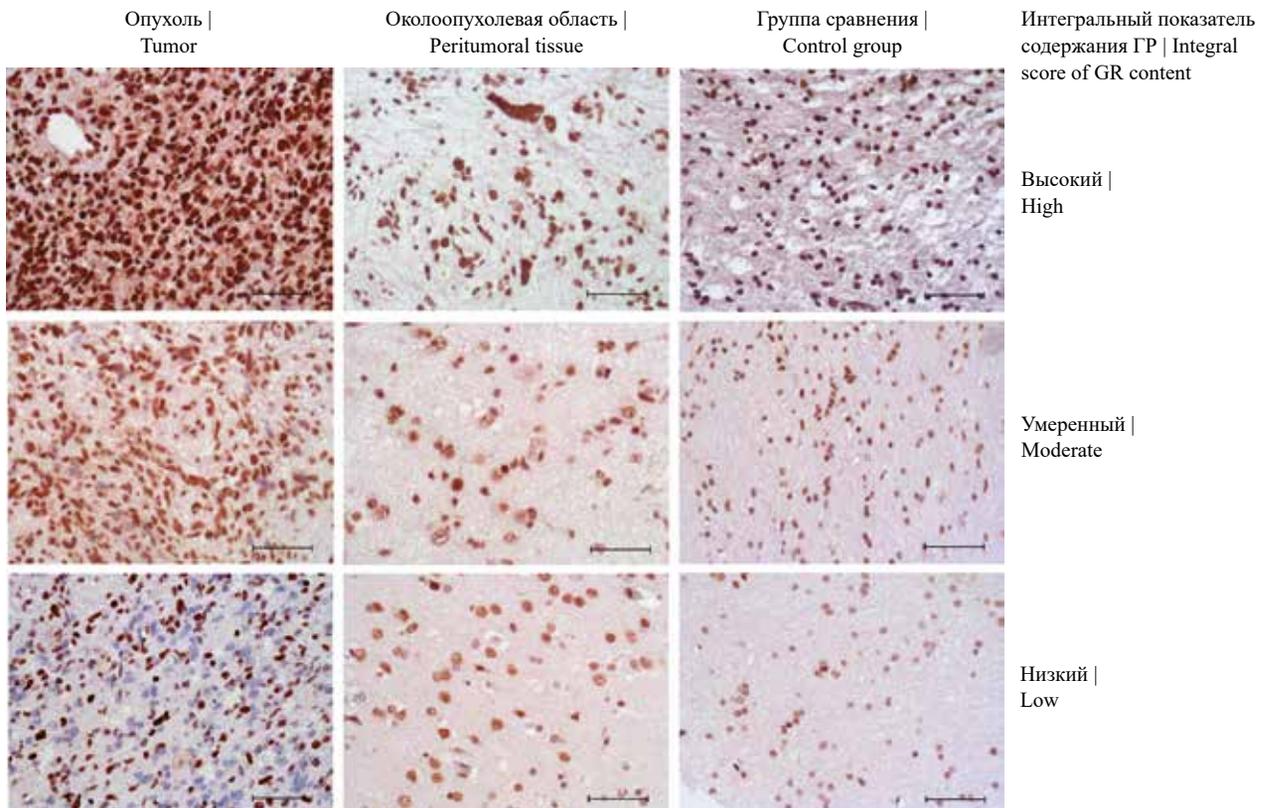


Рис. 2. Образцы опухолевой, околоопухолевой ткани пациентов с ГЛ Gr.4 и ткани головного мозга пациентов с сосудистыми мальформациями, соответствующие высокому, умеренному и низкому ИП ГР. Непрямой двухшаговый иммуногистохимический метод; докраска ядер гематоксилином. Масштабный отрезок 50 μ m

Fig. 2. Samples of glioma grade 4 tissues, peritumoral tissues, and the tissues from the control group with high, moderate, and low integral score of glucocorticoid receptor content. Indirect two-step immunohistochemical method; counterstaining with hematoxylin. Scale bar 50 μ m

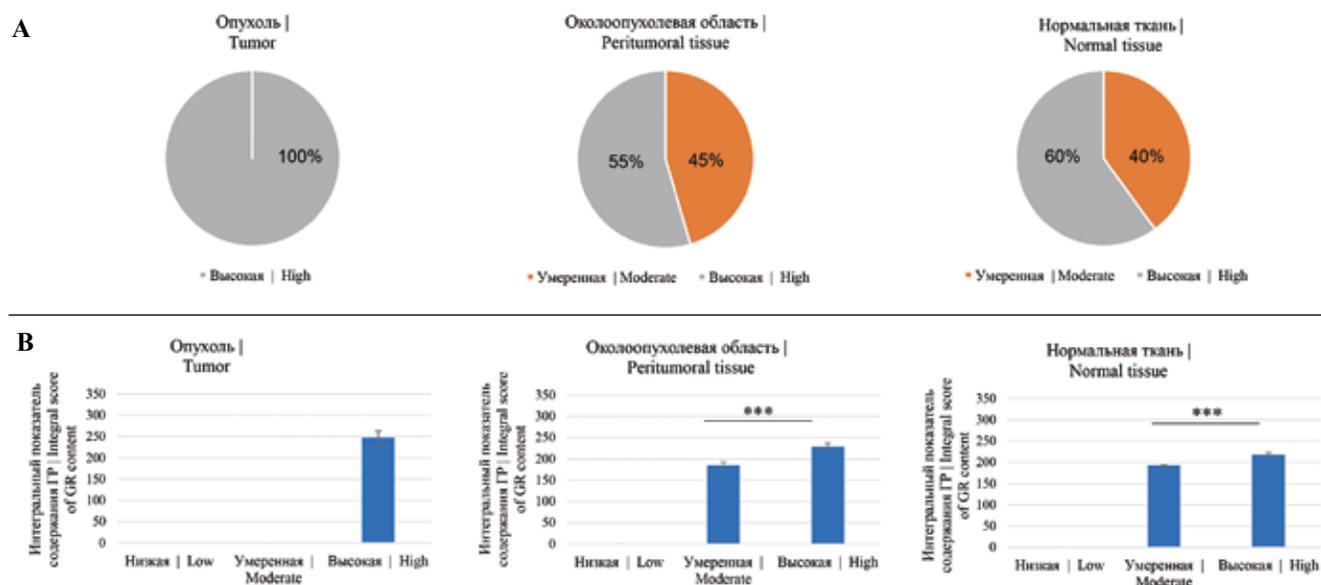


Рис. 3. Содержание ГР у мышей SCID с ортотопическими глиомами U87 и у интактных животных.

А – процентное распределение мышей, имеющих высокую и умеренную экспрессию GR в опухоли (n=11), околоопухолевой ткани (n=11) и в контроле (n=15). Б – график с разбивкой мышей на группы с ИП менее 100 (низкий), от 100 до 200 (умеренный) и от 200 до 300 (высокий) в опухоли (n=11), околоопухолевой ткани (n=11) и в нормальной ткани (n=15)

**p<0,01 – статистически значимые различия

Fig. 3. Glucocorticoid receptor content in the tissues of control and experimental mice

А – the percentage of mice with high, moderate, and low glucocorticoid receptor content in tumor (n=11), peritumoral (n=11), and normal tissues (n=15). Б – the division of animals into groups with the integral score of glucocorticoid receptor content less than 100 (low), from 100 to 200 (moderate), and from 200 to 300 (high)

**p<0.01 – statistically significant differences

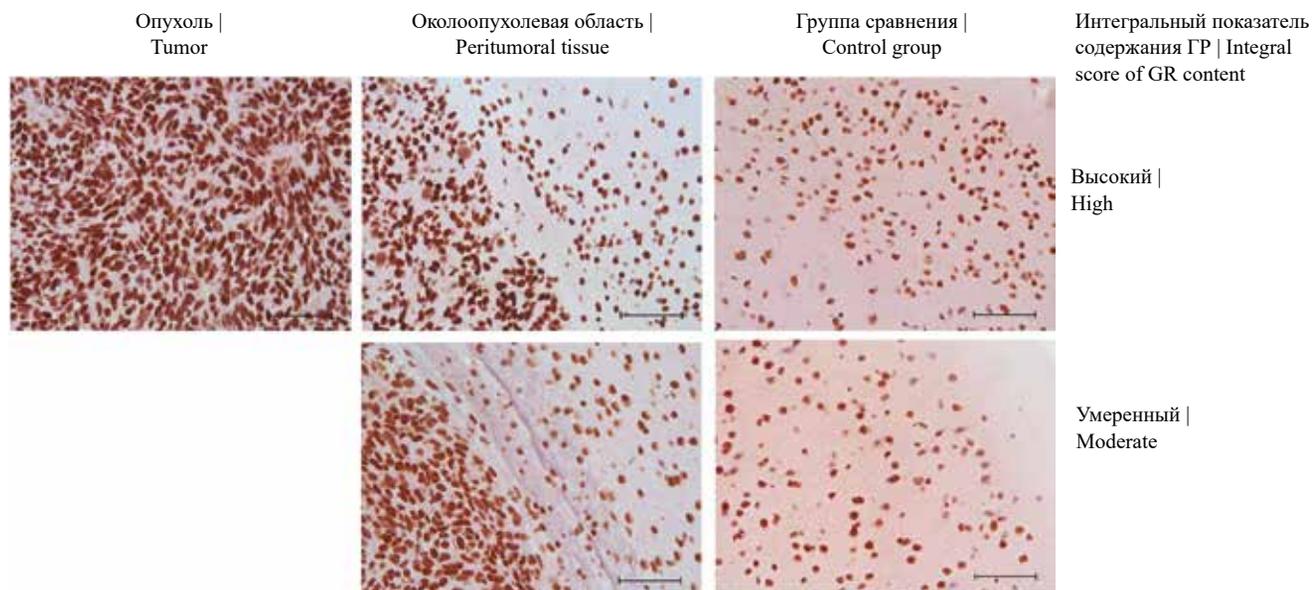


Рис. 4. Образцы опухоли, околоопухолевой ткани головного мозга у мышей линии SCID с ортотопическими глиомами U87 и ткани головного мозга интактных животных, соответствующие высокому, умеренному и низкому интегральному показателю экспрессии глюкокортикоидного рецептора. Непрямой двухшаговый иммуногистохимический метод; докраска ядер гематоксилином. Масштабный отрезок 50 μm

Fig. 4. Samples of tumor, peritumoral, and intact tissues of mice with low, moderate, and high integral score of glucocorticoid receptor content. Indirect two-step immunohistochemical method; counterstaining with hematoxylin. Scale bar 50 μm

па с умеренным содержанием маркера (45%). По ИП экспрессии ГР эти подгруппы статистически значимо отличались ($p=0,008$). У интактных мышей было показано наличие только двух подгрупп, отличающихся уровнем содержания ГР. Доля мышей, относящихся к каждой из подгрупп, не имела существенных различий при сравнении с таковой в ткани околоопухолевой области: 60% составляли животные с высоким содержанием ГР, 40% с умеренным. По ИП содержания ГР эти подгруппы животных также имели статистически значимые отличия ($p=0,0017$) (рис. 3 В).

Результаты иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к ГР, соответствующие умеренному и высокому ИП содержания ГР, у экспериментальных животных представлены на рисунке 4.

У мышей линии SCID с ортотопическими глиомами U87 в опухолевой ткани выявлялось исключительно высокое содержание ГР у всех животных, тогда как в околоопухолевой области и нормальной ткани подгруппы с умеренным и высоким уровнем содержания ГР присутствовали практически в равных долях.

Обсуждение

В нашем исследовании установлено, что у пациентов с ГЛ Gr.4 уровень содержания ГР является индивидуальным и можно выделить подгруппы с различным базовым содержанием белка.

Попытки иммуногистохимической оценки экспрессии ГР в глиомах предпринимались и ранее, но были немногочисленными и выполненными на ограниченной выборке пациентов ($n=8$) [17]. Однако даже в сравнительно малочисленной группе пациентов отмечали межопухолевую гетерогенность и преимущественно высокий уровень содержания ГР (ИП=3). Эти данные совпадают с результатами нашей работы, позволившей на репрезентативной выборке не только подтвердить разницу в содержании ГР у пациентов с ГЛ Gr.4, но и выявить подгруппы, статистически значимо отличающиеся друг от друга по ИП (с высоким, умеренным и низким уровнем ГР). Преобладание в проанализированных клинических образцах высокого содержания ГР с ИП выше 200 также согласуется с выводами предыдущего исследования [17].

В отличие от клинического материала пациентов в опухолях экспериментальных животных регистрировался лишь высокий уровень содержания маркера. Это может объясняться тем, что в эксперименте для получения опухолей животным вводили только одну клеточную линию глиомы U87, а глиомы пациентов являются морфологически гетерогенными и мультиформными. Характерно, что у мышей низкое содержание ГР не выявлялось ни в околоопухолевой, ни в нормальной ткани головного мозга, что отличает их от пациентов и что может быть видовой особенностью данных животных. Таким образом, пациентам с ГЛ Gr.4 свойственна более высокая гетерогенность содержания ГР по сравнению с экспериментальными животными,

что предположительно может быть обусловлено влиянием более гетерогенного микроокружения.

Работы, посвященные изучению характера экспрессии ГР в головном мозге, не измененном опухолевым процессом, также немногочисленны. Методом иммуногистохимии продемонстрировано, что общая интенсивность иммунореактивности ГР в головном мозге была самой высокой в перинатальном периоде, снижалась до низкой интенсивности примерно к 12-му дню постнатального периода, а затем снова постепенно увеличивалась до умеренного окрашивания в большинстве областей мозга [18]. Также удалось установить, что и в нормальной нервной ткани имеет место внутривидовая гетерогенность содержания ГР, в том числе зависящая от возраста и стадии онтогенеза [19]. Результаты, полученные в нашей работе, свидетельствуют о наличии гетерогенного содержания ГР и у линейных мышей одного возраста, что дополняет данные литературы.

Для того чтобы изучить особенности экспрессии ГР в связи с развитием глиальной опухоли, у пациентов с ГЛ Gr.4 и у экспериментальных животных распределение рецептора было также изучено в околоопухолевой ткани и ткани, не измененной опухолевым процессом. Проведенное исследование показало, что в клинике в условном ряду опухоль–околоопухолевая ткань–клинический контроль снижаются доли пациентов, характеризующихся высоким уровнем содержания ГР в головном мозге. У животных при анализе экспериментальных опухолей, околоопухолевой и нормальной ткани головного мозга наблюдалась похожая динамика: снижение содержания ГР в головном мозге по мере уменьшения в исследованных образцах количества опухолевых клеток. Таким образом, можно предположить, что трансформация нервной ткани, сопряженная с опухолевым процессом, сопровождается повышением содержания ГР.

Совокупность полученных данных создает предпосылку для поиска путей использования особенностей содержания ГР в ГЛ Gr.4 в клинических целях. Так, у пациентов с высоким ИП содержания ГР в опухоли можно ожидать лучший ответ на терапию дексаметазоном, чем у пациентов с низким уровнем содержания рецептора. Нельзя оставлять без внимания и тот факт, что глюкокортикоиды воздействуют не только на опухоль, но и на ткань головного мозга, не измененную опухолевым процессом. Ранее было показано, что даже однократное введение дексаметазона в дозировке 2,5 мг/кг мышам вызывало очаговые изменения тинкториальных свойств ядер и цитоплазмы нейронов, а также перицеллюлярный и периваскулярный отек, а при многократном введении препарата эффект на морфологию префронтальной коры оказался более выраженным [20]. Можно предположить, что у пациентов с низким уровнем содержания ГР противоотечное действие глюкокортикоидных препаратов может быть снижено при одновременной инициации нарушений

в окружающей опухоль ткани. Поскольку в настоящее время четкие клинические рекомендации по назначению дексаметазона и корректировке его дозы отсутствуют, иммуногистохимическая оценка содержания ГР в операционных биоптатах пациентов с ГЛ Gr.4 может стать одним из потенциальных инструментов, позволяющих клиницистам предположить эффективность ответа на терапию глюкокортикоидами в послеоперационном периоде.

Заключение

У пациентов с глиомами высокой степени злокачественности Grade 4 зарегистрировано гетерогенное содержание глюкокортикоидного рецептора, характеризующееся наличием трех подгрупп, разных по уровню содержания глюкокортикоидного рецептора с преобладанием высокого. В ортогипотетических экспериментальных глиомах U87 мышей линии SCID выявляется только высокое содержание глюкокортикоидного рецептора. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что высокое содержание глюкокортикоидного рецептора может быть обусловлено самим фактом злокачественного роста опухоли в головном мозге, при котором клетки претерпевают генетические, эпигенетические, транскрипционные и фенотипические изменения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Строкотова, Г.М. Казанская, А.М. Волков.
Сбор и обработка материала – А.М. Волков, Р.С. Киселев, Д.В. Костромская, С.Д. Аладьев, Е.Э. Кливер.
Написание текста – Г.М. Казанская, А.В. Строкотова.
Редактирование – Г.М. Казанская, А.М. Волков, С.В. Айдагулова, Э.В. Григорьева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Strokotova, G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov.
Collected the data and performed the analysis – A.M. Volkov, R.S. Kiselev, D.V. Kostromskaya, S.D. Aladev, E.E. Kliver.
Wrote the paper – G.M. Kazanskaya, A.V. Strokotova.
Edited the manuscript – G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov, S.V. Aidagulova, E.V. Grigorieva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Cruz JVR, Batista C, Afonso BH, Alexandre-Moreira MS, Dubois LG, Pontes B et al. Obstacles to glioblastoma treatment two decades after temozolomide. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13):3203. DOI: 10.3390/cancers14133203.
2. Nikitin PV, Ryzhova MV, Potapov AA, Galstyan SA, Kim DS, Panina TN et al. Intratumoral molecular genetic heterogeneity of glioblastomas. *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(4):5–11. DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.5-11.
3. Reuss DE. Updates on the WHO diagnosis of IDH-mutant glioma. *J Neurooncol*. 2023;162(3):461–9. DOI: 10.1007/s11060-023-04250-5.
4. Targeted glioma therapy makes strides. *Nat Biotechnol*. 2023;41(7):884. DOI: 10.1038/s41587-023-01869-7.
5. Bouffet E, Hansford JR, Garré ML, Hara J, Plant-Fox A, Aerts I et al. Dabrafenib plus trametinib in pediatric glioma with *BRAF* V600 mutations. *N Engl J Med*. 2023;389(12):1108–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2303815.
6. Мацко Д.Е., Мацко М.В., Бакшеева А.О., Имянитов Е.Н., Улитин А.Ю., Моисеенко В.М. и др. Внутритропухлевая морфологическая и молекулярно-генетическая гетерогенность в астроцитомах разной степени злокачественности в материале от первой операции. *Сибирский онкологический журнал*. 2021;20(6):55–68. DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-55-68. Matsko DE, Matsko MV, Baksheeva AO, Imyaninov EN, Ulitin AY, Moiseenko VM et al. Intratumor morphologic and molecular genetic heterogeneity in astrocytomas of different grade of malignancy in the material from the first operation. *Siberian Journal of Oncology*. 2021;20(6):55–68 (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-55-68.
7. Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M et al. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(2):625–38. DOI: 10.1042/BST20180444.
8. Chen HM, Nikolic A, Singhal D, Gallo M. Roles of chromatin remodelling and molecular heterogeneity in therapy resistance in glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):4942. DOI: 10.3390/cancers14194942.
9. Cantidio FS, Gil GOB, Queiroz IN, Regalin M. Glioblastoma – treatment and obstacles. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2022;27(4):744–53. DOI: 10.5603/RPOR.a2022.0076.
10. Wang Q, Lin W, Liu T, Hu J, Zhu Y. Immunological classification of glioblastoma and its prognostic implications. *Am J Transl Res*. 2022;14(11):8009–22. PMID: 36505340.
11. Hoogstrate Y, Draaisma K, Ghisai SA, van Hijfte L, Barin N, de Heer I et al. Transcriptome analysis reveals tumor microenvironment changes in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2023;41(4):678–92.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.019.
12. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schütz G, Tronche F. Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies. *Brain Res Bull*. 2002;57(1):73–83. DOI: 10.1016/s0361-9230(01)00638-4.
13. Sundahl N, Clarisse D, Bracke M, Offner F, Berghe WV, Beck IM. Selective glucocorticoid receptor-activating adjuvant therapy in cancer treatments. *Oncoscience*. 2016;3(7-8):188–202. DOI: 10.18632/oncoscience.315.
14. Keenan CR, Lew MJ, Stewart AG. Biased signalling from the glucocorticoid receptor: renewed opportunity for tailoring glucocorticoid activity. *Biochem Pharmacol*. 2016;112:6–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.02.008.
15. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*. 1995;37(3):496–503; discussion 503–4. DOI: 10.1227/00006123-199509000-00019.
16. Tsidulko AY, Shevelev OB, Khotskina AS, Kolpakova MA, Suhovskikh AV, Kazanskaya GM et al. Chemotherapy-induced degradation of glycosylated components of the brain extracellular matrix promotes glioblastoma relapse development in an animal model. *Front Oncol*. 2021;11:713139. DOI: 10.3389/fonc.2021.713139.

17. Block TS, Murphy TI, Munster PN, Nguyen DP, Lynch FJ. Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. *Cancer Manag Res.* 2017;9:65–72. DOI: 10.2147/CMAR.S124475.
18. Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res.* 1995;24(1):1–46. DOI: 10.1016/0168-0102(96)81278-8.
19. Pryce CR. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: inter-species and intra-species differences. *Brain Res Rev.* 2008;57(2):596–605. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.08.005.
20. Соколов Д.К., Казанская Г.М., Волков А.М., Строкотова А.В., Кливер Е.Э., Григорьева Э.В. и др. Гистологические и иммуногистохимические изменения префронтальной коры головного мозга мышей под действием дексаметазона. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2024;13(3):61–69. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.61-69. Sokolov DK, Kazanskaya GM, Volkov AM, Strokotova AV, Kliver EE, Grigorieva EV et al. Histological and immunohistochemical changes in mouse prefrontal cortex exposed to dexamethasone. *Clinical and experimental morphology.* 2024;13(3):61–69 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.61-69.

Информация об авторах

Галина Михайловна Казанская – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории гликобиологии НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Александр Михайлович Волков – доктор медицинских наук, врач-патологоанатом НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Роман Сергеевич Киселев – кандидат медицинских наук, заведующий научно-исследовательским отделом ангионеврологии и нейрохирургии НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Диана Владимировна Костромская – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Станислав Дмитриевич Аладьев – младший научный сотрудник лаборатории гликобиологии НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Евгений Эдуардович Кливер – доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, профессор кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета.

Светлана Владимировна Айдагулова – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории гликобиологии НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета.

Эльвира Витальевна Григорьева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией гликобиологии НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, доцент кафедры клинической биохимии факультета медицины и психологии В. Зельмана Новосибирского государственного университета.

Анастасия Владимировна Строкотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории гликобиологии НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, старший преподаватель кафедры молекулярной биологии и биотехнологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Author information

Galina M. Kazanskaya – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0003-2598-1805>

Alexander M. Volkov – Dr. Sci. (Med.), Pathologist, E.N. Meshalkin National Medical Research Center.

<https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>

Roman S. Kiselev – Cand. Sci. (Med.), Head of Research Department of Angioneurology and Neurosurgery, E.N. Meshalkin National Medical Research Center.

<https://orcid.org/0000-0001-5110-8378>

Diana V. Kostromskaya – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, E.N. Meshalkin National Medical Research Center.

<https://orcid.org/0009-0004-3991-5336>

Stanislav D. Aladev – Junior Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0001-5883-4831>

Evgeniy E. Kliver – Dr. Sci. (Med.), Head of Pathology Department, E.N. Meshalkin National Medical Research Center; Professor, Pathological Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>

Svetlana V. Aidagulova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Head of the Laboratory of Cellular Biology and Fundamentals of Reproduction, Central Scientific Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-7124-1969>

Elvira V. Grigorieva – Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, V. Zelman Faculty of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University.

<https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

Anastasia V. Strokotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Senior Lecturer, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University.

<https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>

Множественные эффекты ингибитора деления митохондрий mdivi-1 на гранулярные нейроны зубчатой извилины гиппокампа крыс

Д.Н. Воронков¹, А.В. Ставровская¹, А.К. Павлова¹, А.В. Егорова^{1,2},
Е.Н. Федорова^{1,2}, М.С. Рябова¹, В.С. Сухоруков^{1,2}

¹ ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

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

Резюме. *Введение.* Ингибиторы митохондриального деления рассматриваются как перспективные фармакологические агенты с нейропротективным действием, однако их влияние на нейрогенные ниши недостаточно охарактеризовано. Цель исследования – охарактеризовать морфологическими методами влияние mdivi-1 (ингибитора деления митохондрий) на нейроны гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа и нейрогенез в субгранулярной зоне.

Материалы и методы. У крыс линии Вистар после интрацеребровентрикулярного и внутрибрюшинного введения mdivi-1 иммуноморфологическими методами проводили оценку изменений дифференцировки и пролиферации нейрональных предшественников, уровня иммуноокрашивания на синаптические белки и митохондриальных изменений при выявлении белков I, II и V дыхательных комплексов. Кроме того, оценивали влияние mdivi-1 на поведенческие показатели животных в тестах «Открытое поле» и «Т-образный лабиринт».

Результаты. Внутрижелудочковое и внутрибрюшинное введение mdivi-1 уменьшало плотность даблкортин+ нейрональных предшественников, подавляло развитие дендритов и снижало число меченных BrdU нейронов. Подавление нейрогенеза сопровождалось изменениями иммуноокрашивания на синаптические белки синаптофизин и PSD95, увеличением размеров митохондриальной фракции нейронов гранулярного слоя и также изменениями поведения животных. Также обнаружили снижение иммуноокрашивания на ATP5H субъединицу АТФ-синтазы. Эти изменения наблюдали через 14 дней после введения mdivi-1. По-видимому, помимо непосредственного влияния mdivi-1 на синапсы выявленные перестройки синаптических структур в гиппокампе объясняются также результатом подавления нейрогенеза в зубчатой извилине.

Заключение. Ингибитор деления митохондрий mdivi-1 подавляет нейрогенез и вызывает изменения уровня иммуноокрашивания синаптических белков в зубчатой извилине гиппокампа. Выявленные эффекты mdivi-1 демонстрируют роль деления митохондрий в развитии нейронов, наряду с этим их следует учитывать при рассмотрении этого и подобных ингибиторов Drp1 в качестве потенциальных фармакологических препаратов для лечения неврологических заболеваний.

Ключевые слова: деление митохондрий, Drp1, mdivi-1, гиппокамп, нейрогенез

Для корреспонденции: Дмитрий Николаевич Воронков. E-mail: voronkov@neurology.ru

Для цитирования: Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Павлова А.К., Егорова А.В., Федорова Е.Н., Рябова М.С., Сухоруков В.С. Множественные эффекты ингибитора деления митохондрий mdivi-1 на гранулярные нейроны зубчатой извилины гиппокампа крыс. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):58–71. DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.58-71.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00276).

Статья поступила 21.10.2024. Получена после рецензирования 21.11.2024. Принята в печать 02.12.2024.

Multiple effects of mitochondrial division inhibitor mdivi-1 on granular neurons of the dentate gyrus in rats

D.N. Voronkov¹, A.V. Stavrovskaya¹, A.K. Pavlova¹, A.V. Egorova^{1,2},
E.N. Fedorova^{1,2}, M.S. Ryabova¹, V.S. Sukhorukov^{1,2}

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Inhibitors of mitochondrial fission are considered promising pharmacological agents with neuroprotective effects; however, their effects on neurogenic niches have not been sufficiently characterized. The aim was to employ morphological methods to characterize the effect of mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor) on neurons of the granular layer of the dentate gyrus and neurogenesis in the subgranular zone.

Materials and methods. Twenty 4-month male Wistar rats had intracerebroventricular and intraperitoneal mdivi-1 administration. Immunomorphological methods were used to evaluate changes in differentiation and proliferation of neuronal precursors, the level of immunostaining for synaptic proteins, and mitochondrial changes in detecting proteins of respiratory complexes I, II, and V. Moreover, we evaluated the effect of mdivi-1 on behavioral performance of animals in “the open field” and “T-maze” tests.

Results. Intraventricular and intraperitoneal mdivi-1 administration decreased the density of doublecortin-positive neuronal precursors, suppressed dendrite development, and reduced the number of BrdU-labeled neurons in the dentate gyrus. Suppression of neurogenesis was accompanied by changes in immunostaining for the synaptic proteins synaptophysin and PSD95, an increase in the mitochondrial size in neurons of granular layer, and changes in animal behavior. We also detected a decrease in immunostaining for ATP5H subunit of ATP synthase. These changes were observed 14 days after mdivi-1 administration. The inhibitor mdivi-1 is supposed to directly affect synapses. The identified synaptic structural changes are likely to be caused by the resulting inhibition of neurogenesis in the dentate gyrus.

Conclusion. The mitochondrial division inhibitor mdivi-1 suppresses neurogenesis in the dentate gyrus and causes changes in the level of immunostaining of synaptic proteins. The observed effects of mdivi-1 demonstrate the role of mitochondrial fission in neuronal development and should be accounted for when considering mdivi-1 and similar Drp1 inhibitors as potential pharmacologic agents in treating neurological diseases.

Keywords: mitochondrial fission, Drp1, mdivi-1, hippocampus, neurogenesis

Corresponding author: Dmitry N. Voronkov. E-mail: voronkov@neurology.ru

For citation: Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Pavlova A.K., Egorova A.V., Fedorova E.N., Ryabova M.S., Sukhorukov V.S. Multiple effects of mitochondrial division inhibitor mdivi-1 on granular neurons of the dentate gyrus in rats. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):58–71 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.58-71.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00276).

Received 21.10.2024. Received in revised form 21.11.2024. Accepted 02.12.2024.

Введение

Изучению роли митохондриальной динамики, в частности деления митохондрий в норме и при патологии нервной системы, посвящено много исследований [1, 2]. Такие фундаментальные процессы как пролиферация и дифференцировка нейронов, их выживание, рост аксонов и дендритов, формирование синаптических контактов и медиаторный обмен тесно связаны с ремоделированием митохондрий [3]. Изменения морфологии митохондрий по мере развития нейрона в настоящее время достаточно хорошо изучены и коррелируют с адаптационной метаболической перестройкой дифференцирующихся клеток [3, 4]. Установлено, что пролиферирующие нейрональные стволовые клетки имеют удлиненные митохондрии, в предшественниках нейронов органеллы фрагментируются, а по мере дифференцировки клеток отме-

чается нарастание митохондриальной массы, вновь сопровождающееся увеличением длины органелл. Модификация митохондриальной динамики приводит к изменениям нейрогенеза: так, подавление слияния митохондрий угнетает пролиферацию и обновление популяции нейрональных предшественников, а снижение уровня деления митохондрий нарушает их дифференцировку [3–5]. Деление митохондрий традиционно считается событием, индуцирующим апоптоз в различных типах клеток, включая нейроны, но в последние годы рассматривается и как компенсаторный механизм, поддерживающий нейрональные функции и регулирующий синаптическую пластичность [6].

Ключевым белком, опосредующим митохондриальное деление, является цитозольная ГТФаза Drp1 (dynamin related protein), взаимодействующая с адаптерными белками Mff, Fis1, MiD49 и MiD50 на наружной

мембране митохондрий. Адаптерные белки при этом определяют судьбу будущих новообразованных оргanelл, а разнообразие рецепторов обеспечивает тонкую регуляцию функционирования Drp1 [7]. Активность Drp1 задает размер, форму и распределение митохондрий по всему нейрону, от сомы до нервных окончаний. Наибольшее содержание Drp1 обнаруживается в соме и дендритах нейронов, в меньшей степени – в аксонах и аксональных терминалах [8], что коррелирует с особенностями внутриклеточной компарментализации митохондрий [9].

За последние два десятилетия предложено несколько ингибиторов Drp1, обладающих разной селективностью [1] и рассматриваемых как потенциальные терапевтические агенты, так как их нейропротекторные эффекты были продемонстрированы на моделях различных неврологических заболеваний. Помимо этого фармакологические ингибиторы митохондриального деления широко используют в модельных системах для изучения роли митохондриальной динамики в разных клеточных процессах.

Впервые mdivi-1 был описан как ингибитор деления митохондрий, селективно тормозящий активацию Drp1. mdivi-1 препятствует конформационным изменениям Drp1, необходимым для самосборки и гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ), что предотвращает митохондриальное деление [10, 11]. Однако в последнее время появилось достаточно свидетельств о неспецифичности действия mdivi-1 в отношении Drp1 и обсуждаются нецелевые эффекты этого соединения [12, 13].

Наряду с этим многочисленные исследования свидетельствуют о нейропротективном эффекте mdivi-1 при моделировании многих неврологических заболеваний: ишемического инсульта мозга, болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона, а также при черепно-мозговой травме [1, 2, 11, 14, 15]. На животных моделях и *in vitro* mdivi-1 уменьшал выраженность митохондриальных и синаптических нарушений при патологически повышенном уровне Drp1. Например, при ишемическом повреждении гиппокампа mdivi-1 восстанавливал работу дыхательной цепи митохондрий и снижал экспрессию факторов апоптоза [16]. В синаптосомальной фракции стриатума на модели болезни Паркинсона с экспрессией мутантного альфа-синуклеина mdivi-1 вызывал увеличение резервной дыхательной емкости митохондрий [17]. На модели болезни Альцгеймера mdivi-1 снижал накопление амилоида, уменьшал митохондриальную и синаптическую дисфункцию [18]. Из приведенных выше источников следует, что нейропротекторный эффект mdivi-1 включает повышение дыхательной емкости митохондрий, антиапоптотическое действие, предупреждение глутаматной эксайтотоксичности и снижение выработки активных форм кислорода.

Поскольку работ, непосредственно рассматривающих влияние mdivi-1 на структуры мозга в норме, недостаточно, а изучение возможностей регуляции

молекулярных механизмов динамики митохондрий представляет интерес с точки зрения репаративного и адаптационного потенциала нервной ткани, целью исследования было охарактеризовать морфологическими методами влияние mdivi-1 на нейроны гранулярного слоя зубчатой извилины (ЗИ) гиппокампа и процесс нейрогенеза в субгранулярной зоне.

Материалы и методы

Животные

В работе использованы 20 самцов крыс линии Вистар, полученных из питомника «Столбовая», возраст животных на момент начала экспериментов составил 4 месяца. Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), приказом Минздрава России № 119н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», а также руководствуясь Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами (ГОСТ 33216-2014). Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022). Животные содержались в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде при 12-часовом световом режиме. Эксперимент начинали после их 10-дневной адаптации к условиям вивария.

Эксперимент с внутрижелудочковым введением mdivi-1 и введением 5-бромо-2'-дезоксидуридина (BrdU) (группа iv)

Животным (n=10) внутрибрюшинно вводили раствор BrdU («ПанЭко», Россия) в дозе 40 мг/кг, ежедневно, три последовательных дня, каждые 24 часа. Сроком между введением BrdU и введением mdivi-1 был выбран, исходя из времени созревания нейронов в субгранулярной зоне, с целью оценить влияние mdivi-1 на созревание нейронов в ЗИ гиппокампа (рис. 1). Через 2 недели после введения BrdU крысам выполняли стереотаксические операции. Животные получали золетил-ксилазиновый наркоз (золетил-100, 0,3 мг/кг (Virbac, Франция), ксила, 3 мг/кг, внутримышечно (Interchemie Werken De Adelaar, Нидерланды). При помощи стереотаксического аппарата RWD билатерально (координаты по: Paxinos and Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates) вводили mdivi-1 (по 2,33 мкг в 0,1% DMSO, в 0,9% растворе NaCl в каждое полушарие) в желудочки мозга пяти животным, а контрольная группа (ложнооперированные, группа sham – SH, n=5) получала инъекции носителя в том же объеме.

Эксперимент с внутрибрюшинным введением mdivi-1 (группа ip)

mdivi-1 (IM2550, Solarbio) растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma), после чего разбавляли 0,9% раствором NaCl. Конечная эмульсия

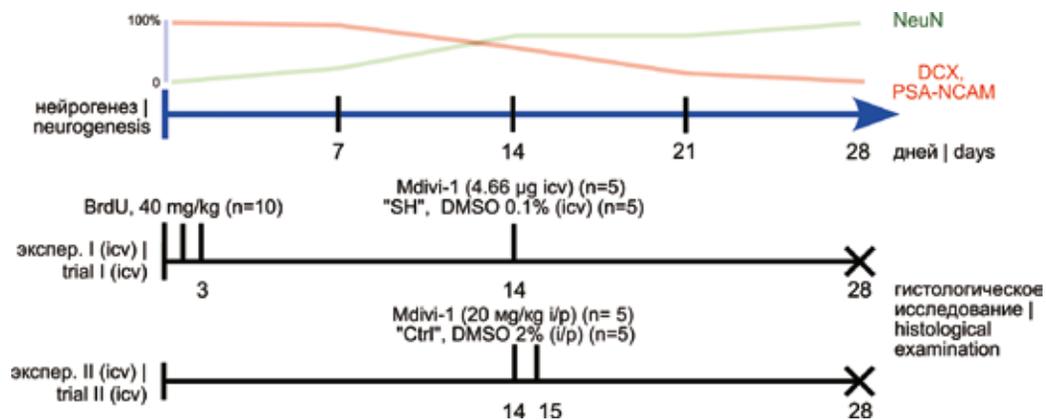


Рис. 1. Схема эксперимента и динамика изменений соотношения DCX+ и NeuN+, меченных BrdU клеток в зубчатой извилине крыс по данным литературы [Snyder, 2009]

Fig. 1. The experimental design and DCX+ and NeuN+ BrdU-labeled cells changes in the dentate gyrus of rats over time [Snyder, 2009]

содержала 2% DMSO и 10 мг/мл mdivi-1, его вводили первой группе животных (n=5) внутривентриально в дозе 20 мг/кг два последовательных дня. Доза была выбрана, исходя из ранее опубликованных данных [15]. Контрольной группе животных (группа control – Ctrl, n=5) внутривентриально вводили только носитель в том же объеме.

Исследование поведения

Поведение животных оценивали до проведения манипуляций и через 14 дней после внутривентриального или внутривентриального введения веществ. Установка «Открытое поле» («Открытая наука», Россия) для оценки двигательной активности представляла собой короб 97×97×40 см из жесткого ПВХ, продолжительность теста – 3 минуты. Регистрацию поведения крыс и последующий анализ данных проводили с помощью системы видеонаблюдения Any-Maze (Stoelting Inc., США) с программным обеспечением.

Для оценки уровня тревожности использовали Т-образный лабиринт («Открытая наука», Россия), приподнятый над полом на 76 см, два закрытых рукава которого имели боковые и торцевые стенки высотой 30 см, а у открытого рукава стенок не было. Ширина рукавов составляла 14 см, длина 50 см, на их пересечении располагался стартовый отсек – площадка размером 10×10 см. В начале эксперимента крысу помещали на начало открытого рукава. Продолжительность теста составляла 3 минуты.

Иммуноморфологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 14-й день после введения mdivi-1 и проведения поведенческих тестов. Крыс декапитировали гильотиной, мозг извлекали и фиксировали 24 часа в 10% формалине. Исследование выполняли на фронтальных срезах, полученных при помощи криостата, 15 мкм толщиной. Использовали антитела против белков ми-

тохондриальных комплексов: субъединицы 30 кДа комплекса I (NDUFS3, ab183733, Abcam, США), субъединицы В сукцинатдегидрогеназы (SDHB, ab175225, Abcam, США), АТФ-синтазы (ATP5H, clone 7F9BG1, Invitrogen, США); синаптических белков: синаптофизина (SYP, ab32127, Abcam, США) и белка постсинаптического уплотнения PSD95 (clone 7E3-1B8, Invitrogen, США); антитела к маркерам нейрональной дифференцировки – даблкортину (DCX, 4604S, Cell Signalling, США), полисиалированной нейрональной молекуле клеточной адгезии (PSA-NCAM, clone 12E3, Invitrogen, США), а также к бромдезоксипуридину (BrdU, Bu20a, Cell Signalling, США) и маркерному белку зрелых нейронов NeuN (ab177487, Abcam, США) для оценки созревания нейрональных предшественников. Перед нанесением антител срезы подвергали температурной демаскировке в пароварке (0,01 М цитратный буфер, 0,05% Tween-60, pH 6,0, +96–98°, 15 минут). Для выявления BrdU срезы выдерживали в 1М HCl 20 минут при температуре +37°. Срезы промывали фосфатным солевым буфером, содержащим 0,05% Triton X-100. Для разведения антител использовали буферный раствор IHC Diluent (Leica Biosystems, США) в соотношении, рекомендованном производителем антител. Для блокирования неспецифического связывания применяли раствор БСА (Protein block, ab64226, Abcam, США). Связывание антител визуализировали при помощи соответствующих вторичных антител осла или козы (Invitrogen, США), меченных флуорохромами Alexa 488 и Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для количественной оценки и документирования использовали микроскоп Nikon Eclipse Ni-u (Nikon, Япония) с камерой Nikon Ds-Qi (Nikon, Япония), программное обеспечение NIS Elements Br и ImageJ-FIJI. При увеличении объектива ×40 измеряли интенсивность флуоресценции (среднюю яркость пикселей в единицах 8-битной шкалы) SDHB, NDUFS3, PSD95, ATP5H в те-

лах нейронов гранулярного слоя гиппокампа (области ядер исключали из измерения), интенсивность флуоресценции при выявлении SYR оценивали во внутреннем молекулярном слое ЗИ. Размеры митохондриальной фракции оценивали по локализации SDHB, как описано ранее [19]. В эксперименте с введением BrdU число BrdU+ и NeuN+ клеток на поле зрения подсчитывали вручную, при увеличении объектива $\times 20$, верифицируя локализацию BrdU в ядрах нейронов при $\times 40$. Число DCX+ клеток оценивали на изображениях, сделанных на всем протяжении ЗИ гиппокампа, и выражали в единицах на 1 мм длины, измеряемой по нижней ее границе. Распределение DCX+ клеток оценивали при помощи функции distance map. На основе оценки кратчайшего расстояния между DCX+ клетками вычисляли индекс агрегации Кларка–Эванса, безразмерный показатель распределения точек на плоскости, возрастающий при кластеризации объектов [20]. Подсчет типов DCX+ нейронов выполняли на препаратах с двойным окрашиванием на DCX/PSA-NCAM для надежной оценки морфологии дендритов по классификации Plumpe [21]. Для количественного анализа использовали не менее 5–12 серийных срезов гиппокампа от животного, взятых из ростральной его трети с интервалом от 120 мкм. Полученные результаты усредняли.

По технической причине (количество срезов) в экспериментах с выявлением PSD95, SDHB, NDUFS3, PSA-NCAM группы контроля для внутрижелудочкового введения составила четыре животных, а для выявления ATR5H все группы были уменьшены на одно животное.

Методы статистического анализа

Статистическую обработку выполняли в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Данные представляли в виде медианы и межквартильного размаха или среднего и среднеквадратичного отклонения (SD). Для сравнения нескольких групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса (K-W ANOVA) с апостериорным тестом Данна. В ряде случаев дополнительно проводили двухфакторный анализ ANOVA с факторами «воздействие» (растворитель или mdivi-1) \times «способ введения» (группы icv или i/p). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Прочие примененные тесты указаны в тексте и подписях к рисункам. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты

mdivi-1 подавляет нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа

Как внутрижелудочковое (группа icv), так и внутрибрюшинное введение mdivi-1 (группа i/p) приводило к значимому снижению количества DCX+ нейрональных предшественников в ЗИ гиппокампа животных (рис. 2), что указывает на уменьшение нейрогенеза. В группе с внутрижелудочковым введением также вы-

являли статистически значимое (K-W ANOVA, $p=0,03$) повышение индекса Кларка–Эванса (возрастающего при кластеризации объектов), что свидетельствует о формировании групп DCX+ клеток у животных под действием mdivi-1.

Анализ соотношения морфологических типов DCX+ нейронов показал, что в группе icv была значимо снижена доля PSA-NCAM+, DCX-содержащих клеток в постмитотической фазе, имеющих длинные и разветвленные дендриты, доходящие до молекулярного слоя (тип E-F, согласно работе [21]). К типу C-D относили нейроны с неразвитыми дендритами, не доходящими до молекулярного слоя, а тип A-B составляли клетки на митотической стадии с короткими отростками или лишённые их (рис. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ показал значимое (ANOVA F (2, 21) = 8,735, $p=0,002$) взаимодействие факторов «тип нейронов» \times «воздействие».

Исходя из этих данных, введение mdivi-1 замедляет дифференцировку нейронов, что подтверждает оценка количества меченных BrdU ядер NeuN+ нейронов (рис. 2). В группе icv под влиянием mdivi-1 число NeuN+/BrdU+ нейронов значимо снижалось (t-тест, $p=0,02$).

Полученные результаты указывают на то, что mdivi-1 подавляет нейрогенез, снижает развитие дендритов у DCX+ нейронов и, по-видимому, влияет на миграцию нейрональных предшественников в субгранулярной зоне гиппокампа, что может отражать выявленная по повышению индекса Кларка–Эванса кластеризация DCX+ клеток.

mdivi-1 вызывает изменения иммуноокрашивания на синаптические белки

Интенсивность окрашивания на синаптофизин (локализованный преимущественно пресинаптически) оценивали во внутреннем молекулярном и полиморфном слое ЗИ (рис. 3). Известно, что внутренняя часть молекулярного слоя представлена преимущественно дендритами гранулярных нейронов и комиссуральными и ассоциативными входами, в то время как аксоны гранулярных клеток формируют синапсы в полиморфном слое. Статистически значимых изменений окрашивания на синаптофизин в полиморфном слое не обнаружили (K-W ANOVA, $p=0,13$), тогда как в молекулярном слое выявили существенное снижение интенсивности окрашивания в группе icv (K-W ANOVA, апостериорный тест Данна, $p=0,02$) и сходную тенденцию для группы с внутрижелудочковым введением (i/p). Двухфакторный анализ ANOVA показал статистически значимое влияние mdivi-1 на содержание синаптофизина в молекулярном слое (фактор «воздействие» ANOVA F (1, 16) = 13,41, $p=0,0021$) и отсутствие влияния способа его введения ($p=0,61$).

Обратные изменения наблюдали в уровне окрашивания на белок постсинаптической плотности PSD95 в гранулярном слое (рис. 3). В группе icv выявляли тенденцию к увеличению, а в группе i/p обнаруживали статистически значимое увеличение интенсивности

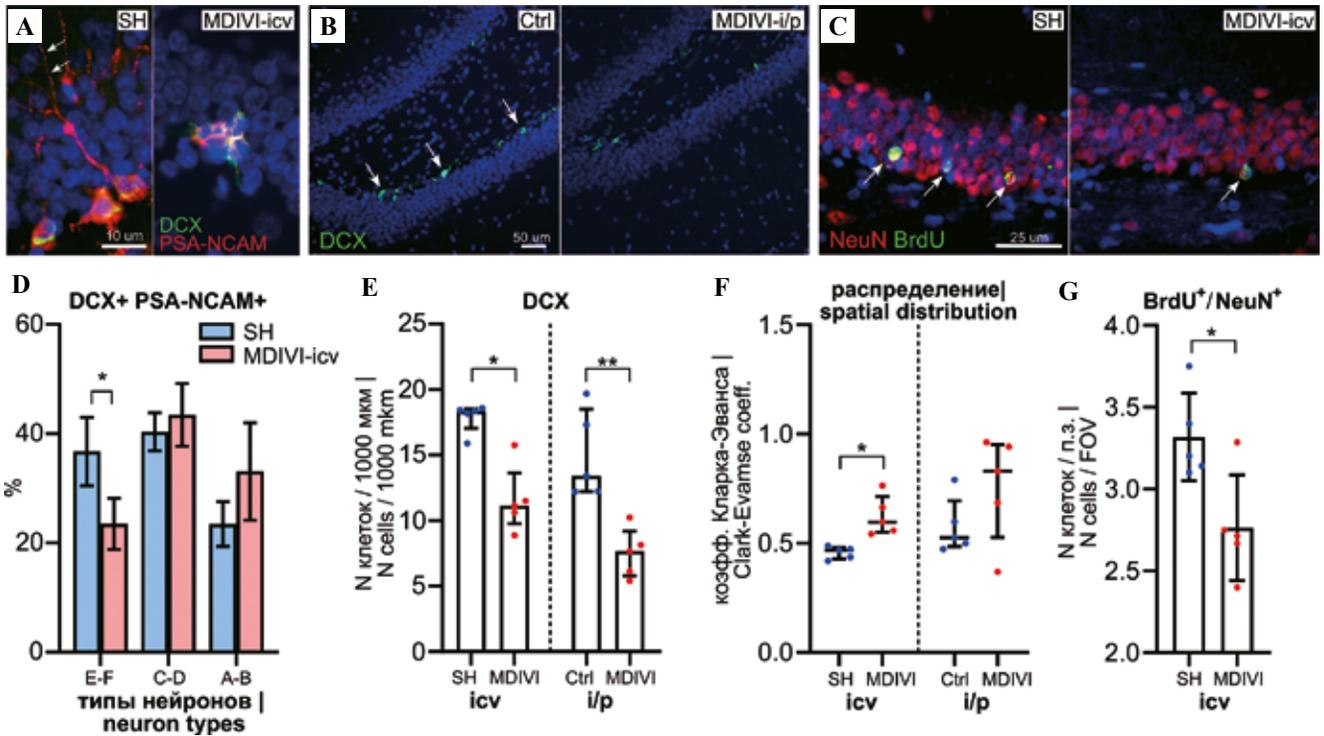


Рис. 2. Изменения нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1.

А – DCX+ (зеленым)/PSA-NCAM+ (красным) клетки в субгранулярной зоне ложнооперированных (SH) и получавших внутримозговые инъекции mdivi-1 (MDIVI-icv) животных. Стрелками показаны дендриты развивающихся нейронов, достигающие молекулярного слоя, характерные для контрольных групп животных. $\times 100$. В – распределение DCX+ клеток у животных контрольной группы (Ctrl) и у животного, получавшего внутримозговые инъекции mdivi-1 (MDIVI-i/p). Стрелки указывают на DCX+ клетки. $\times 10$. С – снижение плотности BrdU+ ядер нейронов в гранулярном слое (окрашивании на NeuN – красным) у ложнооперированных животных и животных, получавших внутримозговые инъекции mdivi-1. Стрелки указывают на ядерную локализацию BrdU в нейронах. $\times 40$. D – процентное соотношение типов DCX+ клеток по возрастанию разветвленности и протяженности дендритов от А до F (по классификации Plümpe, 2006) у ложнооперированных животных и животных, которым внутримозгово вводили mdivi-1. Данные в виде $M \pm SD$, * – $p < 0,05$, двухфакторный тест ANOVA, апостериорный тест Сидак. E – число DCX+ клеток в зубчатой извилине (единиц на 1000 μ m длины). Данные в виде Me (HQ, LQ), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна. F – изменение пространственного распределения DCX+ клеток (коэффициент Кларка–Эванса) в зубчатой извилине под действием mdivi-1. Данные в виде Me (HQ, LQ), * – $p < 0,05$, Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна. G – изменение плотности BrdU+/NeuN+ нейронов в гранулярном слое (единиц на поле зрения). Данные в виде $M \pm SD$, непарный t-тест SH – sham, ложнооперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутримозгово вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутримозгово вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутримозгово вводили mdivi-1

Fig. 2. Changes in neurogenesis in the dentate gyrus following the mdivi-1 treatment.

A – DCX+ and PSA-NCAM+ cells (green and red, respectively) in the subgranular zone of animals that received sham treatment and intraventricular mdivi-1 injections. Arrows show dendrites of developing neurons that reach the molecular layer characteristic of the control group. $\times 100$. B – distribution of DCX+ cells in control animals and an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection. Arrows indicate DCX+ cells. $\times 10$. C – decreased density of BrdU+ neuronal nuclei in the granular layer (immunostaining for NeuN in red) in animals with sham treatment and those with intraventricular mdivi-1 injections. Arrows indicate nuclear location of BrdU in neurons. $\times 40$. D – the percentage of DCX+ cell types by ascending order of branching and dendrite length from “A” to “F” (according to Plümpe classification, 2006) in animals with sham treatment and those with intraventricular mdivi-1 injection. $M \pm SD$, * – $p < 0.05$, two-factor ANOVA, Sidak post-hoc test. E – the number of DCX+ cells in the dentate gyrus (units per 1000 μ m length). Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post-hoc test. F – changes in the spatial distribution of DCX+ cells (Clark-Evans coefficient) in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post-hoc test. G – changes in the density of BrdU+ and NeuN+ neurons in the granular layer (cell per field of view). $M \pm SD$, unpaired t-test SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection

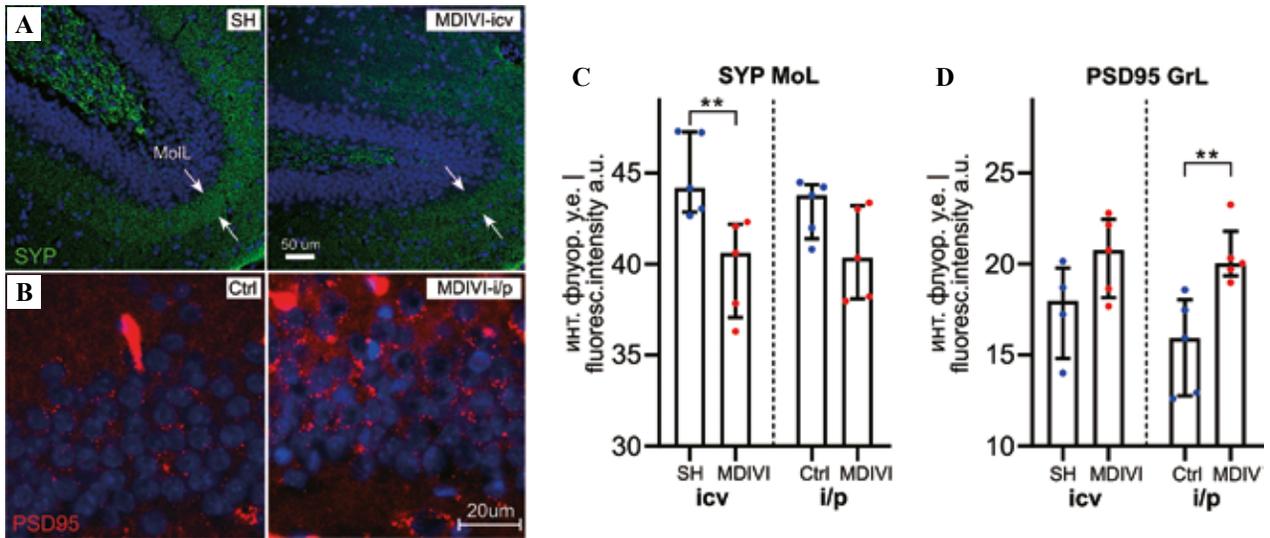


Рис. 3. Изменения интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на синаптические белки в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1.

А – выявление синаптофизина (SYP, зеленым). Снижение интенсивности окрашивания во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины у животного, получавшего внутривентрикулярные инъекции mdivi-1. $\times 100$. В – выявление белка постсинаптического уплотнения (PSD95) (красным). Увеличение точечного окрашивания в гранулярном слое. $\times 40$. С – изменение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на синаптофизин в молекулярном слое под действием mdivi-1. D – изменение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на PSD95 в молекулярном слое под действием mdivi-1

SH – sham, ложнооперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутривентрикулярно вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; MoL – внутренний молекулярный слой зубчатой извилины гиппокампа. Данные в виде Me (LQ; HQ), ** – $p < 0,01$, Тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна

Fig. 3. Changes in the intensity of immunofluorescence staining for synaptic proteins in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. A – detection of synaptophysin (SYP, green). Decreased staining intensity in the inner molecular layer of the dentate gyrus in an animal with an intraventricular mdivi-1 injection. B – detection of postsynaptic density protein PSD95 (red). Increased dot staining in the granular layer. C – change in immunofluorescence intensity for synaptophysin in the molecular layer after mdivi-1 administration. D – change in the immunofluorescence intensity for PSD95 in the molecular layer after mdivi-1 administration. SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MoL – internal molecular layer of the dentate gyrus; GrL – granular layer of the dentate gyrus. Data as Me (LQ; HQ), ** – $p < 0,01$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post-hoc

окрашивания на PSD95 (K-W ANOVA, апостериорный тест Данна, $p < 0,01$). Двухфакторный анализ ANOVA выявил статистически значимое влияние mdivi-1 (фактор «воздействие» ANOVA $F(1, 15) = 13,62$, $p = 0,002$) и отсутствие влияния способа его введения ($p = 0,37$).

Окрашивание на пре- и постсинаптические белки определило их разнонаправленные изменения под действием mdivi-1 в области синаптических контактов с клетками гранулярного слоя. Изменения синаптических связей могут влиять на активность гранулярных нейронов и на нейрогенез в субгранулярной зоне.

Влияние mdivi-1 на митохондрии

В эксперименте с внутривентрикулярным введением mdivi-1 (группа icv) обнаружили статистически значимое увеличение (K-W ANOVA, $p = 0,013$) среднего размера митохондрий (рис. 4) в гранулярном слое – митохондриальной фракции, выявляемой по локализации SDHB, однако в группе i/p таких изменений не выявили.

Двухфакторный анализ ANOVA подтвердил влияние взаимодействия факторов («воздействие» \times «способ введения», $F(1, 15) = 6,5$, $p = 0,022$) на этот показатель, что говорит о разной выраженности ингибирования митохондриального деления и влияния mdivi-1 на митохондриальную морфологию при разных способах введения.

Оценка интенсивности окрашивания на белки дыхательных комплексов I (NDUFS3) и II (SDHB) не выявила значимого влияния mdivi-1 на их содержание в нейронах гранулярного слоя. При этом в дополнительном проведенном тесте было обнаружено значимое (тест Манна–Уитни, $p = 0,02$) снижение интенсивности окрашивания на субъединицу комплекса V (ATP5H) при внутривентрикулярном введении mdivi-1 (окрашивание в группе icv не проводили).

Таким образом, полученные данные демонстрируют влияние mdivi-1 на морфологию митохондрий, но отсутствие изменений экспрессии исследованных белков митохондриальных комплексов, за исключением АТФазы.

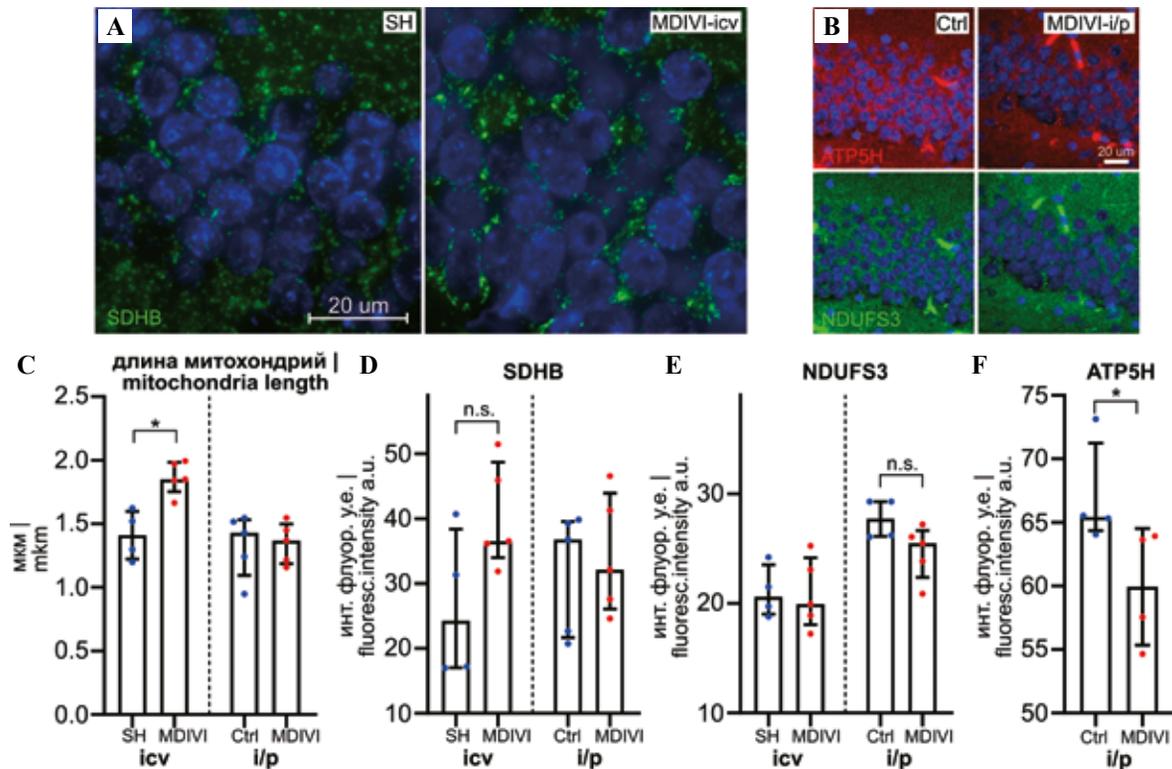


Рис. 4. Изменения митохондриальных показателей в зубчатой извилине гиппокампа под действием mdivi-1. А – выявление сукцинатдегидрогеназы (SDHB, зеленым) в гранулярных нейронах. Увеличение размеров митохондриальной фракции при внутривентрикулярных инъекциях mdivi-1. В – двойное окрашивание на ATP5H-субъединицу АТФ-синтазы (красным) и NDUFS3 (зеленым). С – изменения среднего размера митохондриальной фракции (по окрашиванию на SDHB) в перикарионах нейронов гранулярного слоя под действием mdivi-1. D – интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на SDHB в гранулярном слое. E – интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на NDUFS3 в гранулярном слое. F – изменения интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на ATP5H в гранулярном слое у животных, получавших внутривентрикулярные инъекции mdivi-1. SH – sham, ложнооперированные животные; MDIVI-icv – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; Ctrl – control, животные, которым внутривентрикулярно вводили растворитель; MDIVI-i/p – животные, которым внутривентрикулярно вводили mdivi-1; C, D, E – данные в виде Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, тест Краскела–Уоллиса, апостериорный тест Данна, n.s. – статистически значимых изменений нет. F – данные в виде Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, тест Манна–Уитни

Fig. 4. Changes in mitochondrial indices in the dentate gyrus following mdivi-1 injections. A – detection of succinate dehydrogenase (SDHB, green) in granular neurons. Increase in mitochondrial fraction size, upon intraventricular mdivi-1 injections. B – double staining for ATP5H-subunit of ATP synthase (red) and NDUFS3 (green). C – changes in mean mitochondrial fraction size (by staining for SDHB) in perikaryons of granule cells following mdivi-1 administration. D – the intensity of immunofluorescence staining for SDHB in the granular layer. E – the intensity of immunofluorescence staining for NDUFS3 in the granular layer. F – changes in the intensity of immunofluorescence staining for ATP5H in the granular layer in animals with intraperitoneal mdivi-1 injections. SH – sham treated animals; MDIVI-icv – intraventricular mdivi-1 injection; Ctrl – control animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; MDIVI-i/p – animals with intraperitoneal mdivi-1 injection; C, D, E, – data as Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post-hoc test, n.s. – no statistically significant differences. F – data as Me (HQ, LQ), * – $p < 0.05$, Mann–Whitney test

Изменения поведения животных под действием mdivi-1

В тесте «Т-образный лабиринт» при внутривентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция ($p = 0,06$, тест Вилкоксона) к увеличению соотношения времени нахождения животных в открытом и закрытом рукавах (рис. 4, $p = 0,06$, тест Вилкоксона). При этом число заходов в закрытые рукава значимо не менялось. Интраперитонеальное введение mdivi-1 не привело к изменению времени нахождения в открытом рукаве, однако было отмечено статистически значимое снижение числа заходов в закрытые рукава ($p = 0,049$, ANOVA, апостериорный тест Тьюки, данные не показаны).

В тесте «Открытое поле» введение mdivi-1 не оказало влияния на общую локомоторную активность животных как при интравентрикулярном введении (ANOVA, $p = 0,91$, средняя дистанция составила $10,2 \pm 3,1$ м у ложнооперированных животных и $12,5 \pm 2,4$ м в группе, получавшей mdivi-1), так и при интраперитонеальном (ANOVA, $p = 0,75$, в группе контроля $10,5 \pm 3,9$ м, в группе, получавшей mdivi-1, $9,6 \pm 3,6$ м). При этом в группе icv наблюдали статистически значимое увеличение времени, проводимого животными в центральной зоне арены (рис. 5, $p < 0,01$, тест Вилкоксона, по сравнению с теми же крысами до введения mdivi-1).

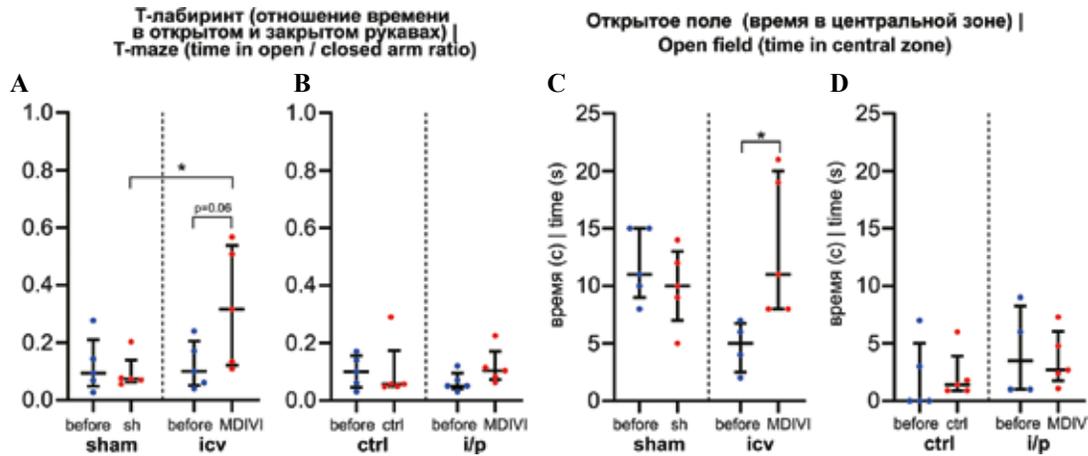


Рис. 5. Изменения поведенческих показателей животных, получавших mdivi-1, в тестах «Т-образный лабиринт» и «Открытое поле».

А – изменения соотношения времени, проведенного животным в открытом и закрытом рукавах Т-образного лабиринта в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1. * – $p < 0,05$, тест Манна–Уитни, $p = 0,06$ – тест Вилкоксона.

В – изменения соотношения времени, проведенного животным в открытом и закрытом рукавах Т-образного лабиринта в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1.

С – изменения времени, проведенного животным в центральной зоне открытого поля в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1* – $p < 0,05$, тест Вилкоксона.

Д – изменения времени, проведенного животным в центральной зоне открытого поля в эксперименте с внутривенным введением mdivi-1.

Обозначения как на рис. 1, before – животные до введения носителя или mdivi-1

Fig. 5. Changes in behavioral parameters of animals with mdivi-1 injections in the T-maze and open-field tests.

А – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection in the open and enclosed arms of the T-maze.

* – $p < 0,05$, Mann-Whitney test, $p = 0,06$, Wilcoxon test. В – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1

injection in the open and enclosed arms of the T-maze. С – changes in time spent by an animal with an intraperitoneal mdivi-1 injection in the central area of the open field* – $p < 0,05$, Wilcoxon test. D – changes in time spent by an animal

with intraperitoneal mdivi-1 injection in the central zone of the open field.

Designations as in Figure 1, before – figures shown by animals before a solvent or mdivi-1 administration

Таким образом, при интрацеребровентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция к увеличению времени нахождения в открытом рукаве в Т-образном лабиринте и в центральной зоне в тесте «Открытое поле», что свидетельствует о снижении тревожности животных.

Обсуждение

Согласно полученным результатам, mdivi-1 влияет на поведение животных при внутривенном введении и многосторонне воздействует на нейроны гранулярного слоя гиппокампа при обоих способах введения – внутривенном и внутривенном. Введение mdivi-1 подавляло нейрогенез и дифференцировку нейронов в ЗИ, при этом оказывало разнонаправленное действие на синаптические белки SYP и PSD95. Мы не обнаружили изменений экспрессии или локализации белков митохондриальных комплексов I и II (NDUFS3 и SDHB), но выявили влияние mdivi-1 на размеры митохондрий лишь в группе, получавшей внутривенные инъекции. В связи с тем, что сведения о метаболизме и фармакокинетике mdivi-1 в литературе не представлены, неясно, являются ли выявленные в нашей работе отсроченные изменения размеров митохондрий результатом непосредственного блокирования связывания mdivi-1 и Drp1 или это вторичные явления. В дополнение к этому обнаруженное

снижение интенсивности окрашивания на субъединицу АТФ-синтазы АТР5Н указывает на воздействие mdivi-1 на дыхательную цепь митохондрий.

Работы последних лет демонстрируют роль митохондрий в нейрогенезе [4]. Дифференцировка нейральных стволовых клеток, их созревание и миграция сопровождаются активацией деления митохондрий и переключением метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что обусловлено возрастающими потребностями клеток в АТФ [4]. При этом изменения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий связаны с балансом митохондриальной динамики, что предполагает ключевую роль слияния и деления митохондрий в определении судьбы клеток.

Обнаруженное нами снижение уровня нейрогенеза в субгранулярной зоне гиппокампа под действием mdivi-1, очевидно, связано с его влиянием на митохондриальные процессы. Вместе с тем действие mdivi-1 на эти органеллы неоднозначно. Основной акцент в изучении активности mdivi-1 как потенциально высокоспецифичного ингибитора ГТФазы Drp1 был сделан на подавление патологической фрагментации митохондрий [11, 15]. В более поздних работах описаны непосредственное связывание и ингибирующий эффект mdivi-1 в отношении митохондриального комплекса I, приводящий к снижению продукции АТФ [12, 13].

Так, в работе N. Marx et al. [13] показано, что *mdivi-1* нарушает сборку комплекса I митохондрий и респираторных суперкомплексов, необходимых для эффективного транспорта электронов. Мы не выявили изменений иммуноокрашивания комплекса I, но обнаружили снижение интенсивности окрашивания на АТФ-синтазу, что может объясняться описанными N. Marx et al. нарушениями работы электрон-транспортной цепи, нарушением продукции АТФ и гомеостаза Ca^{2+} под действием *mdivi-1*. Отметим, что показанное в нашей работе отсутствие изменений в интенсивности флуоресценции при выявлении NDUF3 не исключает образование дефектных форм комплекса I, как это было продемонстрировано в [13].

Обе предполагаемые мишени *mdivi-1* – как комплекс I митохондрий, так и *Drp1* – тесно связаны с дифференцировкой нейрональных предшественников. Известно, что изменения митохондриальной динамики в дифференцирующихся нейронах сопровождаются увеличением экспрессии *Drp1* [19, 22], а его нокаут подавляет нейрогенез и нарушает дифференцировку нейронов [23]. Было показано, что индукция слияния митохондрий с помощью *mdivi-1* вскоре после деления нейральных стволовых клеток блокирует их дальнейшую дифференцировку [5]. Другим важным аспектом влияния *Drp1* как мишени для *mdivi-1* может быть его участие в регуляции биогенеза пероксисом [24].

Для нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне ранее описано снижение миграции под действием *mdivi-1*, что согласуется с нашими результатами для субгранулярной зоны гиппокампа. Так, в работе H.J. Kim et al. [22] описано, что миграция нейрональных предшественников сопровождается энергезависимым ремоделированием цитоскелета, с чем связана локализация митохондрий у переднего полюса дифференцирующихся нейронов, а ингибирование *Drp1* приводит к перинуклеарной конденсации митохондрий и нарушает миграцию клеток-предшественников. Слияние митохондрий и увеличение их размеров могут препятствовать изменению их распределения в клетке и нарушать миграцию нейрональных предшественников [22]. Эти результаты согласуются с нашими данными об образовании кластеров DCX+ клеток в субгранулярной зоне гиппокампа после введения *mdivi-1*.

Поскольку *Drp1*-зависимая фрагментация митохондрий связана с поздними стадиями апоптоза, возникает вопрос о влиянии *mdivi-1* на нейрогенез через антиапоптотические механизмы. Участие *Drp1* в индукции апоптоза дифференцирующихся клеток неоднозначно, например в плюрипотентных стволовых клетках оверэкспрессия *Drp1* предотвращала апоптоз, усиливая митофагию, и наоборот, при их дифференцировке уменьшение активности *Drp1* снижало митофагию и усиливало апоптоз [25]. Работ, посвященных влиянию *mdivi-1* на апоптоз в гранулярной извилине гиппокампа в норме, мы не обнаружили, хотя есть данные о снижении под действием *mdivi-1* апоптоза ней-

рональных предшественников на генетической модели болезни Дауна [26] и уменьшении активации каспазы-3 наряду со снижением высвобождения цитохрома-С в культуре нейральных стволовых клеток при окислительном стрессе [27]. Кроме того, в литературе обсуждается роль апоптотических белков для обеспечения специфических нейрональных процессов, например участие каспаз в росте и прунинге аксонов и синаптической пластичности [28]. *mdivi-1*, ингибируя *Drp1*, вероятно, может действовать на эти процессы, влияя и на регуляцию апоптотических каскадов.

При нейрогенезе в зрелом мозге важную роль играет отбор нейронов путем апоптоза при их включении в уже существующие нейронные сети. По-видимому, в связи с этим на этапе дифференцировки и раннего синаптогенеза отмечается потеря 30–70% незрелых нейронов в нейрогенных зонах в зрелом мозге грызунов [29]. По данным оценки нейрогенеза, в зрелом мозге крыс количество BrdU+ клеток в зубчатой извилине наиболее выражено снижается начиная со 2-й недели после введения BrdU, достигая 62% от начального количества к 4-й неделе, после чего не меняется [30]. Снижение числа NeuN– (незрелых) клеток происходит между 1-й и 4-й неделями, причем наибольшее снижение отмечается до 2-й недели, а к четырем неделям NeuN- клеток не остается. Прирост числа NeuN+ нейронов происходит в аналогичном объеме и временном интервале, что указывает на то, что многие NeuN клетки в этот период дифференцируются в нейроны [30].

Таким образом, усиление деления митохондрий в нейрональных предшественниках, связанное с переключением клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование, а также на более поздних этапах с ростом дендритов [31], по-видимому, предшествует этапу наиболее выраженной апоптотической гибели вновь образованных нейронов. Можно предположить, что вероятное снижение под действием *mdivi-1* уровня апоптоза и его нейропротективное действие нивелировались в нашем эксперименте нарушениями на более ранних этапах нейрогенеза, ассоциированными с ремоделированием митохондрий, а также влиянием *mdivi-1* на митохондриальные комплексы, что приводило к выявленному снижению плотности DCX+ нейрональных предшественников и количества NeuN+/BrdU+ клеток в гранулярном слое. Оценка влияния *mdivi-1* на апоптоз в нейрогенных нишах и регуляцию численности вновь образованных нейронов требует дальнейших исследований.

Чтобы оценить влияние *mdivi-1* на созревание нейронов гранулярного слоя, мы провели анализ выраженности ветвления дендритов DCX+ клеток в молекулярном слое. В нейронах гранулярного слоя ЗИ гиппокампа наиболее многочисленными и сложно организованными являются митохондрии дендритных шипиков, что, вероятно, обусловлено их участием в обеспечении синаптической передачи. Показано, что в ходе постнатального нейрогенеза в ЗИ дендритные митохондрии изначально фрагментированы [32], что может быть

необходимо для их распределения вдоль растущих дендритов. По мере интеграции вновь образованных нейронов в существующие нейрональные сети происходит усложнение формы митохондрий. В нашем исследовании морфологическая оценка DCX+ предшественников показала снижение количества DCX+ клеток с длинными, разветвленными дендритами под влиянием mdivi-1, что указывает на нарушения формирования фенотипа зрелых гранулярных нейронов.

Выявленные нами на морфологическом уровне изменения локализации и экспрессии синаптических белков дополняются данными литературы о влиянии mdivi-1 на синаптические процессы. Так, на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний выявляли повышение синаптической активности под действием mdivi-1, что связывают с восстановлением митохондриальных функций [17, 18]. Например, mdivi-1 снижал фрагментацию митохондрий и восстанавливал экзоцитоз синаптических везикул, сниженный под действием бета-амилоида [33]. Этим данным противоречит упомянутая ранее публикация N. Marx et al. [13], в которой в нормальных условиях выявили снижение нейротрансмиссии под влиянием mdivi-1.

Мы предполагаем, что влияние Drp1 на синаптическую передачу не ограничивается вкладом в аксональную биоэнергетику, что может приводить к неоднозначности в экспериментальных данных. Являясь потенциальной мишенью для mdivi-1, динаминподобный белок Drp1 помимо обеспечения деления митохондрий участвует в механизмах эндоцитоза и оборота синаптических везикул, что подтверждают многочисленные исследования на генетических моделях. Кроме того, вызывает интерес сообщение о различии влияния mdivi-1 на морфологию митохондрий нейронов и астроцитов, что может иметь значение для глияльной поддержки нейротрансмиссии [34]. У мышей с дефицитом Drp1 были снижены синаптическая передача нейронов гиппокампа и биоэнергетические функции аксональных митохондрий [35, 36], уменьшалось число пресинаптических митохондрий и наблюдалась потеря дендритных шипиков [37]. При этом в более ранней работе у гетерозиготных нокаутных по Drp1 мышей изменения локализации и экспрессии синаптических белков не обнаружены [38]. Последнее не согласуется с выявленным нами снижением окрашивания на белок постсинаптической плотности PSD95 под действием mdivi-1 и подчеркивает, что результаты, получаемые на нокаутных животных, ограниченно применимы для объяснения эффектов фармакологического ингибирования Drp1 в силу компенсаторных процессов. Полученные в настоящей работе результаты могут объясняться как увеличением синтеза PSD95 в ответ на нарушения синаптической передачи, вызываемой mdivi-1, так и структурными изменениями области постсинаптического уплотнения, что требует дальнейших исследований.

По недавно опубликованным данным [39], активация Drp1 необходима для созревания синапсов.

Согласно ряду работ, Drp1 вносит вклад в формирование везикулярного пула в развивающихся синапсах и регулирует оборот синаптических везикул в пресинаптических и постсинаптических окончаниях гиппокампальных нейронов [16, 40]. Эти работы на нокаутных по Drp1 животных, демонстрирующие нарушение оборота синаптических везикул при недостаточности Drp1, согласуются с данными N. Marx et al. [13], которыми на культуре нейронов было показано снижение под действием mdivi-1 нейрональной активности и экспрессии синтаксина-4, белка SNARE комплекса, обеспечивающего слияние везикул с пресинаптической мембраной. Впрочем, последние авторы объясняют нарушением энергетической функции митохондрий, а не влиянием mdivi-1 на везикулярный эндоцитоз.

Снижение иммуноокрашивания на синаптофизин, выявленное в нашей работе, может быть ассоциировано с влиянием mdivi-1 как на эндоцитоз везикул, так и на аксональную энергетику. Помимо этого, обнаруженное снижение синаптофизина в молекулярном слое может быть связано с уменьшением нейрогенеза и синаптогенеза нейронов гиппокампа.

Наряду с морфологическими изменениями mdivi-1 в проведенном исследовании оказывал влияние на тревожноподобное поведение грызунов. При интравентрикулярном введении mdivi-1 наблюдалась тенденция к увеличению времени нахождения в открытом рукаве в Т-образном лабиринте и центральной зоне в тесте «Открытое поле», что свидетельствует о снижении тревожности. Важно отметить, что при интраперитонеальном введении mdivi-1 такой эффект не наблюдался, что может быть связано с различиями в биодоступности mdivi-1 для структур мозга при разных способах введения и в целом подтверждается данными нашего исследования, в котором ряд изменений наблюдался в группе, получавшей mdivi-1 интраперитонеально, только на уровне тенденции. При этом наблюдаемые эффекты mdivi-1 на поведение не сопровождалось изменениями в общей двигательной активности животных, что исключает возможность седативного действия препарата. Эти результаты согласуются с данными других немногочисленных исследований влияния mdivi-1 на поведение. Так, в работе по моделированию черепно-мозговой травмы указано [41], что внутрибрюшинное введение mdivi-1 контрольным животным не вызывало изменений в пройденной дистанции в тесте «Открытое поле».

Что касается влияния нокаута Drp1 на поведение, при частичном нокауте у мышей не было обнаружено отличий в двигательной активности и тесте распознавания объекта [42], а в другой работе [43] описаны различия нокаутных животных от мышей дикого типа по показателям в тесте Морриса, что может указывать на изменения функций гиппокампа. Интересно, что воздействие mdivi-1 отличалось по поведенческим эффектам от менее селективного ингибитора Drp1 – динасора (Dynasore), ингибитора ГТФаз, для которого показаны сходные с mdivi-1 антиоксидативные и нейропротек-

торные эффекты, а также подавление нейрональной миграции [44, 45]. Введение динасора в стриатум ослабляло двигательную активность мышей в тесте «Открытое поле», но не влияло на тревожноподобное поведение [45]. Различия в эффектах mdivi-1 и динасора могут объясняться тем, что динасор ингибирует действие и других ГТФаз, участвующих в различных клеточных процессах.

Таким образом, в проведенном исследовании удалось продемонстрировать влияние mdivi-1 на митохондрии нейронов гранулярного слоя ЗИ гиппокампа, снижение нейрогенеза и дифференцировки нейрональных предшественников в субгранулярной зоне гиппокампа под действием mdivi-1, что сопровождалось изменениями иммуноокрашивания на синаптические белки в ЗИ гиппокампа, а также изменениями поведения животных.

Эффекты краткосрочного применения mdivi-1 сохранялись через 14 дней, а снижение дифференцировки нейрональных предшественников в гиппокампе незначительно зависело от способа введения препарата. Нельзя исключить, что помимо непосредственного влияния mdivi-1 выявленные перестройки синаптических структур в гиппокампе объясняются и ответом на подавление нейрогенеза в ЗИ, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Множественность эффектов mdivi-1 и его влияние на нейрогенез следует учитывать при рассмотрении этого и подобных ингибиторов Drp1 в качестве потенциальных фармакологических препаратов и нейротропаторов при неврологических заболеваниях. Как показало наше исследование, ингибирование Drp1 вызывает перестройки биоэнергетики и морфологии митохондрий, изменяет организацию синаптических структур в гиппокампе, оказывает воздействие на дифференцировку и созревание нейронов, что может существенно влиять на ожидаемые эффекты препаратов, направленных на регуляцию митохондриальной динамики.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, А.В. Егорова, А.К. Павлова, Е.Н. Федорова, В.С. Сухоруков.

Сбор и обработка материала – Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, А.К. Павлова, А.В. Егорова, Е.Н. Федорова, М.С. Рябова.

Написание текста – Д.Н. Воронков, Е.Н. Федорова, А.В. Егорова, А.К. Павлова.

Редактирование – В.С. Сухоруков, Д.Н. Воронков.

Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, A.V. Egorova, A.K. Pavlova, E.N. Fedorova, V.S. Sukhorukov.

Collected the data and performed the analysis – D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, A.K. Pavlova, A.V. Egorova, E.N. Fedorova, M.S. Ryabova.

Wrote the paper – D.N. Voronkov, E.N. Fedorova, A.V. Egorova, A.K. Pavlova.

Edited the manuscript – V.S. Sukhorukov, D.N. Voronkov.

Благодарность

Авторы выражают благодарность Алине Вадимовне Чаплыгиной, научному сотруднику Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», за помощь в проведении исследования.

Acknowledgements

The authors would like to thank Alina Vadimovna Chaplygina, Research Associate at the Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, a separate division of Federal Research Center “Pushchino Research Center for Biological Studies, Russian Academy of Sciences” for her assistance in conducting the study.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9.
2. Fedorova EN, Egorova AV, Voronkov DN, Mudzhiri NM, Baranich TI, Glinkina VV et al. DRP1 regulation as a potential target in hypoxia-induced cerebral pathology. *J Mol Pathol.* 2023;4(4):333–48. DOI: 10.3390/jmp4040027.
3. Choi HW, Kim JH, Chung MK, Hong YJ, Jang HS, Seo BJ et al. Mitochondrial and metabolic remodeling during reprogramming and differentiation of the reprogrammed cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(11):1366–73. DOI: 10.1089/scd.2014.0561.
4. Khacho M, Slack RS. Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: from development to the adult brain. *Dev Dyn.* 2018;247(1):47–53. DOI: 10.1002/dvdy.24538.
5. Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science.* 2020;369(6505):858–62. DOI: 10.1126/science.aba9760.
6. Kleele T, Rey T, Winter J, Zaganelli S, Mahecic D, Perreten Lambert H et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature.* 2021;593(7859):435–9. DOI: 10.1038/s41586-021-03510-6.
7. Tagaya M, Arasaki K. Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Adv Exp Med Biol.* 2017;997:33–47. DOI: 10.1007/978-981-10-4567-7_3.
8. Luo TT, Dai CQ, Wang JQ, Wang ZM, Yang Y, Zhang KL et al. Drp1 is widely, yet heterogeneously, distributed in the mouse central nervous system. *Mol Brain.* 2020;13(1):90. DOI: 10.1186/s13041-020-00628-y.
9. Егорова А.В., Воронков Д.Н., Федорова Е.Н., Баранчик Т.И., Глинкина В.В., Сухоруков В.С. Особенности строения и функции митохондрий в нейронах и глиоцитах различных отделов головного мозга лабораторных грызунов. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
10. Egorova AV, Voronkov DN, Fedorova EN, Baranich TI, Glinkina VV, Sukhorukov VS. Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents. *Clinical and experimental morphology.* 2022;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
11. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T et al. Chemical inhibition of the mitochondrial divi-

- sion dynamin reveals its role in bax/bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*. 2008;14(2):193–204. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.11.019.
11. Liu X, Song L, Yu J, Huang F, Li Y, Ma C. Mdivi-1: a promising drug and its underlying mechanisms in the treatment of neurodegenerative diseases. *Histol Histopathol*. 2022;37(6):505–12. DOI: 10.14670/HH-18-443.
 12. Bordt EA, Zhang N, Waddell J, Polster BM. The non-specific Drp1 inhibitor mdivi-1 has modest biochemical antioxidant activity. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(3):450. DOI: 10.3390/antiox11030450.
 13. Marx N, Ritter N, Disse P, Seebohm G, Busch KB. Detailed analysis of Mdivi-1 effects on complex I and respiratory supercomplex assembly. *Sci Rep*. 2024;14(1):19673. DOI: 10.1038/s41598-024-69748-y.
 14. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2011;67(1-2):103–18. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2010.11.004.
 15. Nhu NT, Li Q, Liu Y, Xu J, Xiao SY, Lee SD. Effects of Mdivi-1 on neural mitochondrial dysfunction and mitochondria-mediated apoptosis in ischemia-reperfusion injury after stroke: a systematic review of preclinical studies. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:778569. DOI: 10.3389/fnmol.2021.778569.
 16. Li H, Alavian KN, Lazrove E, Mehta N, Jones A, Zhang P et al. A Bcl-xL–Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nat Cell Biol*. 2013;15(7):773–85. DOI: 10.1038/ncb2791.
 17. Bido S, Soria FN, Fan RZ, Bezard E, Tieu K. Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- α -synuclein rat model of Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):7495. DOI: 10.1038/s41598-017-07181-0.
 18. Wang W, Yin J, Ma X, Zhao F, Siedlak SL, Wang Z et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model. *Hum Mol Genet*. 2017;26(21):4118–31. DOI: 10.1093/hmg/ddx299.
 19. Voronkov DN, Egorova AV, Fedorova EN, Stavrovskaya AV, Lebedeva OS, Olshanskiy AS et al. Mitochondrial dynamics and metabolic remodeling in a xenograft of human iPSC-derived neural precursors. *J Evol Biochem Physiol*. 2024;60(3):920–9. DOI: 10.1134/S0022093024030062.
 20. Kendall TJ, Duff CM, Thomson AM, Iredale JP. Integration of geoscience frameworks into digital pathology analysis permits quantification of microarchitectural relationships in histological landscapes. *Sci Rep*. 2020;10(1):17572. DOI: 10.1038/s41598-020-74691-9.
 21. Plümpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M et al. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*. 2006;7:77. DOI: 10.1186/1471-2202-7-77.
 22. Kim HJ, Shaker MR, Cho B, Cho HM, Kim H, Kim JY et al. Dynamin-related protein 1 controls the migration and neuronal differentiation of subventricular zone-derived neural progenitor cells. *Sci Rep*. 2015;5:15962. DOI: 10.1038/srep15962.
 23. Vantaggiato C, Castelli M, Giovarelli M, Orso G, Bassi MT, Clementi E et al. The fine tuning of Drp1-dependent mitochondrial remodeling and autophagy controls neuronal differentiation. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:120. DOI: 10.3389/fncel.2019.00120.
 24. Kamerkar SC, Kraus F, Sharpe AJ, Pucadyil TJ, Ryan MT. Dynamin-related protein 1 has membrane constricting and severing abilities sufficient for mitochondrial and peroxisomal fission. *Nat Commun*. 2018;9(1):5239. DOI: 10.1038/s41467-018-07543-w.
 25. Pernaute B, Pérez-Montero S, Sánchez Nieto JM, Di Gregorio A, Lima A, Lawlor K et al. DRP1 levels determine the apoptotic threshold during embryonic differentiation through a mitophagy-dependent mechanism. *Dev Cell*. 2022;57(11):1316–30.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2022.04.020.
 26. Valenti D, Rossi L, Marzulli D, Bellomo F, De Rasmio D, Signorile A et al. Inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission improves mitochondrial dynamics and bioenergetics stimulating neurogenesis in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(12):3117–27. DOI: 10.1016/j.bbdis.2017.09.014.
 27. Kim S, Kim C, Park S. Mdivi-1 protects adult rat hippocampal neural stem cells against palmitate-induced oxidative stress and apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1947. DOI: 10.3390/ijms18091947.
 28. Hollville E, Romero SE, Deshmukh M. Apoptotic cell death regulation in neurons. *FEBS J*. 2019;286(17):3276–98. DOI: 10.1111/febs.14970.
 29. Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W, Yu SW. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain*. 2016;9:43. DOI: 10.1186/s13041-016-0224-4.
 30. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci*. 2009;29(46):14484–95. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009.
 31. Bonzano S, Dallorto E, Bovetti S, Studer M, De Marchis S. Mitochondrial regulation of adult hippocampal neurogenesis: insights into neurological function and neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Dis*. 2024;199:106604. DOI: 10.1016/j.nbd.2024.106604.
 32. Kochan SMV, Malo MC, Jevtic M, Jahn-Kelleter HM, Wani GA, Ndoci K et al. Enhanced mitochondrial fusion during a critical period of synaptic plasticity in adult-born neurons. *Neuron*. 2024;112(12):1997–2014.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2024.03.013.
 33. Baek SH, Park SJ, Jeong JI, Kim SH, Han J, Kyung JW et al. Inhibition of Drp1 ameliorates synaptic depression, A β deposition, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease model. *J Neurosci*. 2017;37(20):5099–110. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2385-16.2017.
 34. Chaplygina AV, Zhdanova DY. Effects of mitochondrial fusion and fission regulation on mouse hippocampal primary cultures: relevance to Alzheimer's disease. *Aging Pathobiol Ther*. 2024;6(1):08–17. DOI: 10.31491/APT.2024.03.132.
 35. Shields LY, Kim H, Zhu L, Haddad D, Berthet A, Pathak D et al. Dynamin-related protein 1 is required for normal mitochondrial bioenergetic and synaptic function in CA1 hippocampal neurons. *Cell Death Dis*. 2015;6(4):e1725. DOI: 10.1038/cddis.2015.94.
 36. Divakaruni SS, van Dyke AM, Chandra R, LeGates TA, Contreras M, Dharmasri PA et al. Long-term potentiation requires a rapid

- burst of dendritic mitochondrial fission during induction. *Neuron*. 2018;100(4):860–75.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.09.025.
37. Park G, Lee JY, Han HM, An HS, Jin Z, Jeong EA et al. Ablation of dynamin-related protein 1 promotes diabetes-induced synaptic injury in the hippocampus. *Cell Death Dis*. 2021;12(5):445. DOI: 10.1038/s41419-021-03723-7.
 38. Manczak M, Sesaki H, Kageyama Y, Reddy PH. Dynamin-related protein 1 heterozygote knockout mice do not have synaptic and mitochondrial deficiencies. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):862–74. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.02.017.
 39. Gao Q, Tian R, Han H, Slone J, Wang C, Ke X et al. PINK1-mediated Drp1^{S616} phosphorylation modulates synaptic development and plasticity via promoting mitochondrial fission. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):103. DOI: 10.1038/s41392-022-00933-z.
 40. Itoh K, Murata D, Kato T, Yamada T, Araki Y, Saito A et al. Brain-specific Drp1 regulates postsynaptic endocytosis and dendrite formation independently of mitochondrial division. *Elife*. 2019;8:e44739. DOI: 10.7554/eLife.44739.
 41. Song Y, Li T, Liu Z, Xu Z, Zhang Z, Chi L et al. Inhibition of Drp1 after traumatic brain injury provides brain protection and improves behavioral performance in rats. *Chem Biol Interact*. 2019;304:173–85. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.03.013.
 42. Fan RZ, Sportelli C, Lai Y, Salehe SS, Pinnell JR, Brown HJ et al. A partial Drp1 knockout improves autophagy flux independent of mitochondrial function. *Mol Neurodegener*. 2024;19(1):26. DOI: 10.1186/s13024-024-00708-w.
 43. Kandimalla R, Manczak M, Pradeepkiran JA, Morton H, Reddy PH. A partial reduction of Drp1 improves cognitive behavior and enhances mitophagy, autophagy and dendritic spines in a transgenic Tau mouse model of Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*. 2022;31(11):1788–805. DOI: 10.1093/hmg/ddab360.
 44. Chen Y, Xu S, Wang N, Ma Q, Peng P, Yu Y et al. Dynasore suppresses mTORC1 activity and Induces autophagy to regulate the clearance of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res*. 2019;36(1):108–16. DOI: 10.1007/s12640-019-00027-9.
 45. Feng ST, Wang ZZ, Yuan YH, Wang XL, Guo ZY, Hu JH et al. Inhibition of dynamin-related protein 1 ameliorates the mitochondrial ultrastructure via PINK1 and Parkin in the mice model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol*. 2021;907:174262. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174262.

Информация об авторах

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

Алла Вадимовна Ставровская – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной патологии нервной системы и фармакологии Научного центра неврологии.

Анастасия Кирилловна Павлова – лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной патологии нервной системы и фармакологии Научного центра неврологии.

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

Евгения Николаевна Федорова – лаборант-исследователь лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии, ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Мария Сергеевна Рябова – лаборант-исследователь лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

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

Author information

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

Alla V. Stavrovskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System and Neuropharmacology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Anastasia K. Pavlova – Research Assistant, Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System and Neuropharmacology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0009-0006-5653-5524>

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

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

Maria S. Ryabova – Research Assistant, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0009-0003-5596-7630>

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

Сравнение гистохимических методов Ли и Маллори для выявления ишемических повреждений миокарда

В.С. Щекин¹, Ю. Ванг², А.И. Лебедева¹, С.А. Муслимов¹,
И.И. Терезулов¹, А.О. Власова¹, Р.Р. Загитов¹, А.В. Самородов¹

¹ ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, Россия

² Ханчжоуский педагогический университет, Ханчжоу, Китай

Резюме. *Введение.* В патологоанатомической практике одним из базовых методов выявления раннего ишемического повреждения кардиомиоцитов является гистохимическое окрашивание гематоксилином – основным фуксином – пикриновой кислотой (ГОФП) по методу Ли. В результате применения этого метода саркоплазма ишемизированных кардиомиоцитов окрашивается основным фуксином в красно-коричневый цвет, тогда как интактные миоциты приобретают желтую окраску за счет пикриновой кислоты. Существуют критические оценки применения окрашивания по Ли в посмертной диагностике. Исходя из изложенного, представляется целесообразным дополнить метод Ли таким же доступным и информативным гистохимическим методом. Для улучшения диагностики мы включили в исследование метод окрашивания по Маллори, в котором в отличие от окрашивания по Ли используется кислый фуксин.

Материалы и методы. Исследование выполнено с использованием аутопсийного и экспериментального материала. Аутопсийный материал включал в себя 23 случая различных нозологий, сопровождавшихся острой сердечной недостаточностью. Экспериментальный материал представлял собой две модели острого повреждения миокарда. В первом эксперименте на 22 крысах ишемию воспроизводили прекращением перфузии изолированного сердца по методу Лангендорфа, во втором на 28 крысах создавали физическую нагрузку на миокард методом принудительного плавания с грузом до полного утомления.

Результаты. Окрашивание по Маллори так же, как и по Ли, позволяет выявить фуксинофильный субстрат, указывающий на ишемическое повреждение кардиомиоцитов различного происхождения как на аутопсийном, так и на экспериментальном материале. Поврежденные кардиомиоциты, положительно окрашенные основным фуксином, имеют красно-коричневый цвет на интактном желтом фоне. При окрашивании по Маллори они обладают оранжево-красным цветом на красно-фиолетовом фоне. В экспериментальных моделях наблюдается полное соответствие результатов обоих методов, окрашивание по Маллори характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью (96,88 и 92,31%). В секционных наблюдениях совпадение результатов окрашивания отмечено в 82%. Также при окрашивании по Маллори становятся видны участки фиброза, выявляемые анилиновым синим.

Заключение. Окрашивание трихромом по Маллори может служить дополнительным методом верификации ишемических повреждений миокарда при исследовании аутопсийного и экспериментального материала. Помимо выявления признаков ранней ишемии оно дает возможность оценить хроническую ишемию миокарда по характеру фиброзных изменений. Метод хорошо воспроизводим и доступен в каждодневной практике.

Ключевые слова: окрашивание ГОФП, окрашивание по Маллори, ишемия миокарда

Для корреспонденции: Влас Сергеевич Щекин. E-mail: vlas-s@mail.ru

Для цитирования: Щекин В.С., Ванг Ю., Лебедева А.И., Муслимов С.А., Терезулов И.И., Власов А.О., Загитов Р.Р., Самородов А.В. Сравнение гистохимических методов Ли и Маллори для выявления ишемических повреждений миокарда. Клини. эксп. морфология. 2025;14(3):72–79. DOI: 10.31088/SEM2025.14.3.72-79.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 24-45-00071 (грант-партнер NSFC: № 82361138563).

Статья поступила 11.11.2024. Получена после рецензирования 15.02.2025. Принята в печать 17.02.2025.

Comparative analysis of Lie and Mallory methods for detecting myocardial ischemic injury

V.S. Shchekin¹, Y. Wang², A.I. Lebedeva¹, S.A. Muslimov¹,
I.I. Teregulov¹, A.O. Vlasova¹, R.R. Zagitov¹, A.V. Samorodov¹

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² Hangzhou Normal University, Hangzhou, China

Abstract. Introduction. In pathological practice, one of the primary histochemical methods for detecting early ischemic damage to cardiomyocytes is staining with hematoxylin-basic fuchsin-picric acid (HBFP), commonly known as the Lie method. HBFP staining results in red-brown staining of the sarcoplasm of ischemic cardiomyocytes due to basic fuchsin, while intact myocytes appear yellow due to picric acid. However, critical evaluations have raised concerns about using the Lie method in postmortem diagnosis. Therefore, to improve the diagnosis of early ischemic damage, it appears reasonable to supplement the Lie method with an equally accessible and informative histochemical approach, which is why our study included the Mallory staining method, as this technique employs acid fuchsin, but differs in its staining profile from the Lie method.

Materials and methods. The study was performed using autopsy and experimental materials. The autopsy material included 23 samples of various nosologies accompanied by acute heart failure. The experimental material included 50 rats, in which two types of experiments modeled acute myocardial injury. The first one was conducted on 22 rats, in which ischemia was induced by perfusion arrest in isolated hearts using the Langendorff method. In the other 28 animals, ischemic injury was stimulated through forced swimming with a load until exhaustion.

Results. Both Mallory and Lie staining methods allow for identifying a fuchsinophilic substrate indicative of ischemic damage to cardiomyocytes of various origins in both autopsy and experimental materials. Damaged cardiomyocytes positively stained with basic fuchsin appeared red-brown against an intact yellow background, while Mallory staining produced orange-red against a red-purple background. In the experimental models, the results of both staining methods were in full agreement, with Mallory staining demonstrating high sensitivity (96.88%) and specificity (92.31%). In sectional observations, staining results were consistent between the two methods in 82% of cases. Additionally, Mallory staining revealed areas of fibrosis when aniline blue was employed.

Conclusion. Mallory trichrome staining can serve as a supplementary method for verifying ischemic myocardial damage in both autopsy and experimental materials. Beyond detecting early signs of ischemia, it also enables the assessment of chronic myocardial ischemia via visualization of fibrotic changes. The method is reproducible and accessible in everyday practice.

Keywords: HBFP staining, Mallory staining, myocardial ischemia

Corresponding author: Vlas S. Shchekin. E-mail: vlas-s@mail.ru

For citation: Shchekin V.S., Wang Y., Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Teregulov I.I., Vlasov A.O., Zagitov R.R., Samorodov A.V. Comparative analysis of Lie and Mallory methods for detecting myocardial ischemic injury. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):72–79 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.72-79.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 24-45-00071 (NSFC Grant Partner: No. 82361138563).

Received 11.11.2024. **Received in revised form** 15.02.2025. **Accepted** 17.02.2025.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания, среди которых лидирует ишемическая болезнь сердца, занимают ведущее место среди причин смертности населения в России и в мире [1]. Морфологическим субстратом ишемической болезни является выраженное в той или иной степени повреждение кардиомиоцитов вследствие нарушения кровотока в коронарных сосудах [2]. Кроме этого, при патоморфологическом исследовании приходится учитывать изменения в миокарде, связанные с проведенными при жизни кардиохирургическими операциями [3–6].

Диагностика раннего ишемического повреждения миокарда после смерти остается сложной задачей как для патологоанатомов, так и для судебно-медицинских экспертов [7]. Хотя при жизни можно выявлять изменения с помощью электрокардиографии (ЭКГ) или лабораторных тестов с использованием кардиоспецифических маркеров, таких как тропонин Т, I и КФК-МВ, эти данные не всегда находят подтверждение при посмертном гистологическом исследовании на светооптическом уровне.

В патологоанатомической практике одним из основных методов выявления раннего ишемического повреждения кардиомиоцитов является комбинированное гистохимическое окрашивание гематоксилином – основным фуксином – пикриновой кислотой (ГОФП), описанное J.T. Lie et al. в 1971 году и названное ими фуксиноррагическим методом. Термин «фуксиноррагия» был предложен авторами как альтернатива термину «фуксинофилия», обозначающему известную реакцию Г. Селье на повреждение кардиомиоцитов с использованием в качестве красителя кислого фуксина. Результат реакции по методу Ли, или методу ГОФП, характеризуется красно-коричневым окрашиванием основным фуксином саркоплазмы ишемизированных кардиомиоцитов, тогда как интактные миоциты приобретают желтую окраску, иногда с зеленоватым оттенком. При этом размеры очагов красно-коричневых кардиомиоцитов коррелируют с развитием ишемии миокарда. Отмечено, что при наступлении некроза кардиомиоцитов фуксинофильный субстрат исчезает. Наиболее вероятным механизмом возникновения фуксинофильного субстрата считается взаимодействие фуксина как катионного красителя с продуктами распада гликогена в саркоплазме кардиомиоцитов с окрашиванием их в красно-коричневый цвет [8]. Метод окрашивания ГОФП имеет высокую специфичность в эксперименте [9].

Тем не менее существуют и критические оценки метода ГОФП. Некоторые авторы отмечают частые случаи ложноположительного и ложноотрицательного окрашивания, а также неравномерное распределение красителя фуксина в нормальных тканях [10, 11].

Обнаружено несколько факторов, существенно влияющих на положительный результат реакции при окрашивании по методу ГОФП: аутолиз ткани в аутопсийном материале, время фиксации и толщина срезов [12]. Воспроизводимость окрашивания и достижение высокого уровня согласованности в интерпретации результатов возможны только при использовании тщательно стандартизованных процедур. Изложенное выше, а также результаты собственных исследований позволили сделать вывод, что применение одного критерия для диагностики раннего инфаркта миокарда и/или ишемического повреждения кардиомиоцитов не может решить диагностическую проблему.

Современные методы, такие как иммуногистохимия [13], поляризационная микроскопия [14] и т.п., значительно повышают диагностические возможности патологоанатомического исследования, однако их применение в повседневной практике сопряжено с определенными трудностями.

Представляется целесообразным дополнить метод ГОФП таким же доступным и информативным гистохимическим методом. Наше внимание привлек метод окрашивания трихромом по Маллори, в котором в отличие от ГОФП используется не основной, а кислый фуксин [10]. Как отмечено выше, для выявления фук-

синофильного субстрата в кардиомиоцитах изначально использовался кислый фуксин в окрашивании по Селье. Позже J.T. Lie подтвердил, что окрашивание кислым фуксином способно определять поврежденные участки миокарда в эксперименте, однако специфика окрашивания требует подтверждения [15].

Окрашивание по Маллори широко распространено, используется преимущественно для выявления компонентов соединительной ткани [16] и для идентификации ранней ишемии кардиомиоцитов ранее не применялось.

Цель исследования – провести сравнительный анализ информативности методов ГОФП и окрашивания по Маллори при выявлении ранних ишемических повреждений миокарда.

Материалы и методы

Исследование выполнено с использованием аутопсийного и экспериментального материала. Аутопсийный материал (23 случая) пациентов с различными нозологическими формами, преимущественно сопровождающимися острой сердечной недостаточностью, был получен из архива патологоанатомического отделения городской клинической больницы № 21 Уфы. Для верификации ложноположительных результатов вследствие аутолиза ткани во всех случаях учитывалось время, прошедшее после смерти до момента аутопсии. Основным диагнозом в 10 случаях был инфаркт миокарда, в семи – постинфарктный кардиосклероз, в шести – другая нозологическая форма. Во всех случаях в клинике фиксировалась острая сердечная недостаточность с помощью функциональных методов (ЭКГ, эхокардиография) и лабораторных исследований (миоглобиновая фракция креатинкиназы, тропонины I, T). Вскрытие проводилось в промежутке от 12 до 48 часов с момента наступления биологической смерти, при этом для исследования брали от двух до четырех кусочков миокарда.

Экспериментальная работа выполнена на 50 белых беспородных половозрелых самцах крыс (225,7±22,4 грамма), которые содержались в условиях вивария Башкирского государственного медицинского университета при комнатной температуре и обычном рационе с неограниченным доступом к питьевой воде в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), утвержденных правил проведения лабораторных доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 3 51000.3-96, ГОСТ 51000.4-96, ГОСТ 50258-92) и лабораторной практики (приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 № 708н). Исследования одобрены этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 12.10.2020, протокол № 63 от 22.08.2022).

Для получения экспериментального материала были проведены два вида исследований, отличающихся воспроизведением ишемического воздействия на миокард. В первом эксперименте у 22 крыс воспроизводили ишемию миокарда прекращением перфузии изолированного сердца по методу Лангендорфа [17], а во втором у 28 крыс воспроизводили физическую нагрузку на миокард методом принудительного плавания с грузом до полного утомления [18].

Методика первого эксперимента заключалась в следующем. Животным под тиопенталовым наркозом («Синтез АКО ОАО», Россия) была проведена операция по выделению магистральных сосудов сердца. Затем орган извлекали и помещали в раствор Кребса–Хензеля с карбогеном [17] с последующим подключением к системе для перфузии («КардиоПротект», Россия). После стабилизационного периода начинался 30-минутный период ишемии, далее перфузия возобновлялась на 2 часа. После реперфузии сердце фиксировали в растворе 10% забуференного нейтрального формалина («БиоВитрум», Россия), а зону ишемии определяли макроскопически с помощью трифенилтетразолия хлорида («ЛенРеактив», Россия). Суть второго эксперимента – принудительное плавания крыс с грузом до полного утомления как модель анаэробной физической нагрузки, при которой преимущественно используется гликолиз как источник энергии, и в крови растет уровень лактата. Этот тест проводили ежедневно в течение 30 дней утром, с 09:00 до 11:00. Масса груза составляла 10% от массы тела крыс. В качестве наркоза использовали хлоралгидрат («Химпром-М», Россия), извлекали сердца после инсuffляции летальной дозы паров хлороформа («ЭКОС-1», Россия).

Сердца фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине («БиоВитрум», Россия). Для патогистологического исследования вырезали пять поперечных сегментов миокарда, которые затем подвергали стандартной проводке в изопропиловом спирте («БиоВитрум», Россия) и уплотнению ткани в парафине «гистомикс» («БиоВитрум», Россия). Срезы из одной парафиновой ленты окрашивали по методу ГОФП («БиоВитрум», Россия) и трихромом по Маллори («БиоВитрум», Россия). Готовые стеклопрепараты были отсканированы на Pannoramic 250 (3DHISTECH Ltd, Венгрия) с последующим изучением гистологических срезов при разном увеличении с помощью программы CaseViewer (3DHISTECH Ltd, Венгрия). В микропрепаратах, окрашенных ГОФП и трихромом по Маллори, определяли выраженность повреждения миокарда полуколичественным методом: 0 баллов – интактный миокард, 1 балл – минимальная выраженность (<26% миокарда), 2 балла – от минимального до умеренного уровня (26–50% миокарда), 3 балла – умеренный уровень (51–75% миокарда), 4 балла – тяжелое повреждение (>75% миокарда) [19].

Статистический анализ данных выполняли в программе Statistica 12 (StatSoft Inc., США). Для выявления

нормального распределения количественные показатели оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки различий между группами использовали критерий χ^2 Пирсона.

Результаты

Анализ экспериментального и аутопсийного материала показал, что ишемически измененные кардиомиоциты при окрашивании по методу ГОФП содержали фуксинофильный субстрат с типичной красно-коричневой окраской. Интактные миоциты окрашивались в желтый цвет. При использовании трихрома по Маллори ишемизированные кардиомиоциты имели красно-оранжевую окраску, интактные мышечные волокна окрашивались в пурпурно-фиолетовый цвет (рис.).

На аутопсийном материале при окрашивании по ГОФП в 14 случаях ишемические повреждения кардиомиоцитов не выявлены (0 баллов), в восьми случаях наблюдалась минимальная выраженность повреждения (1 балл), в одном случае – от минимального до умеренного уровня (2 балла). При окрашивании трихромом по Маллори патология не была выявлена в 10 случаях (0 баллов), в 12 случаях – 1 балл, в одном случае – 2 балла. Таким образом, в 17 случаях оценки по баллам совпадали между двумя методами, а в четырех случаях наблюдалось расхождение, причем при окрашивании по методу ГОФП оценки составляли 0 баллов, а при трихромом по Маллори – 1 балл. Критерий χ^2 Пирсона не выявил статистически значимой разницы между показателями окрашивания ($p=0,475$).

При исследовании миокарда перфузируемого сердца были получены следующие результаты. В срезах, окрашенных с применением методов ГОФП и Маллори, кардиомиоциты с признаками ишемического повреждения выявлялись очагово в субэпикардальной зоне миокарда и были диффузно распределены в субэндокардальной зоне. При оценке выраженности повреждения в баллах результаты совпадали полностью.

При окрашивании сердца крыс с вынужденной физической нагрузкой обоими методами положительная гистохимическая реакция отмечалась преимущественно в субэпикардальной зоне миокарда. В участках окрашивания продемонстрирована фуксинофилия. Количество баллов при подсчете выраженности повреждения миокарда совпадало.

В таблице представлены результаты количественной оценки чувствительности и специфичности обоих методов в группах аутопсийного и экспериментального материала. Из представленных данных видно, что на аутопсийном материале окрашивание трихромом по Маллори обладает более высокой чувствительностью, однако оба метода демонстрируют относительно низкие показатели, что может быть связано с началом аутолиза ткани. Напротив, при экспериментальных моделях окрашивание одинаково высокочувствительно и высокоспецифично.

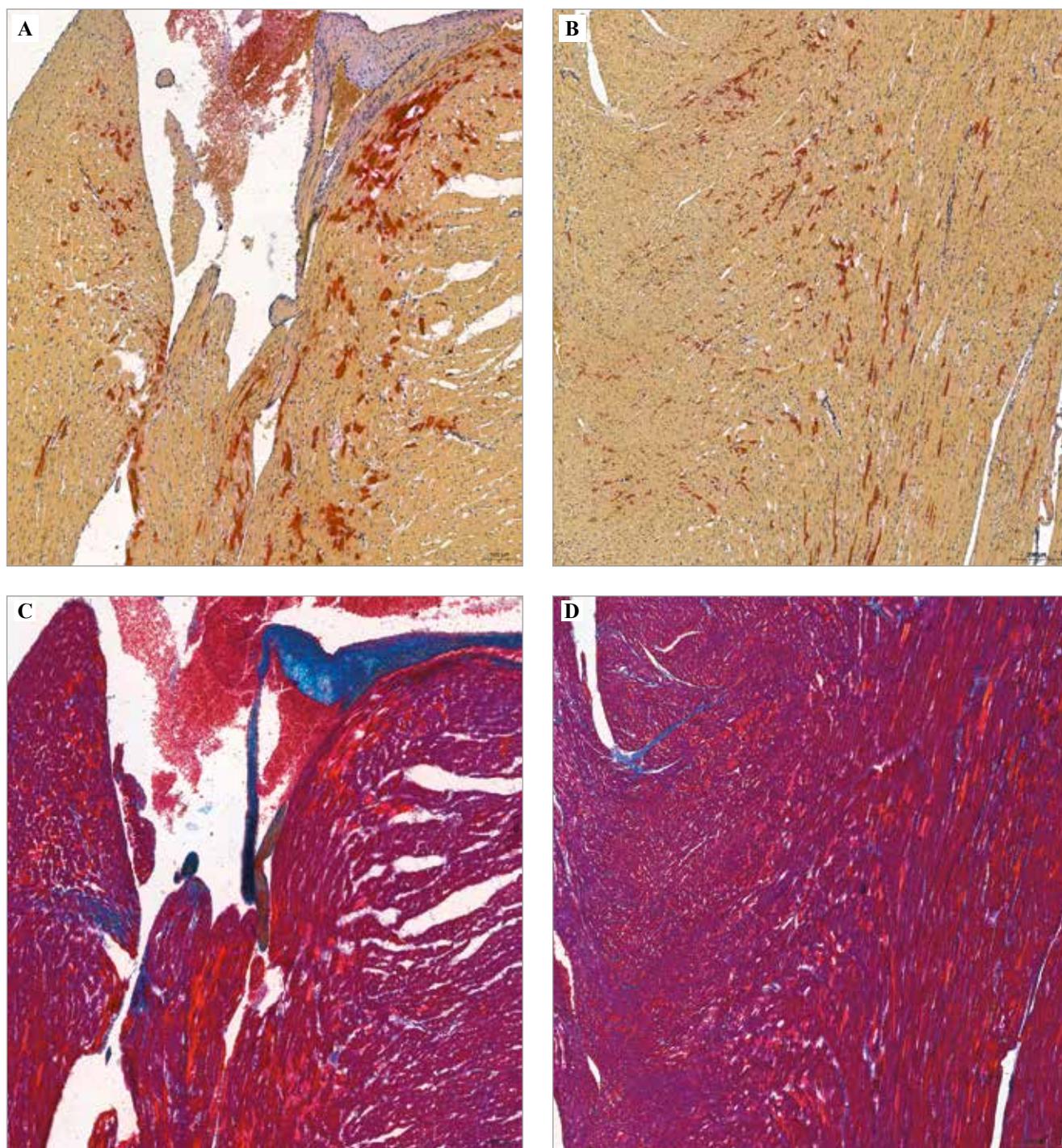


Рис. Сопоставление результатов окрашивания по методу ГОФП и Маллори в сердце крыс.

A, B – преимущественно субэндокардиальная локализация острых повреждений кардиомиоцитов,

C, D – преимущественно интрамуральная локализация острых повреждений кардиомиоцитов. A, B – окраска по методу ГОФП, C, D – окраска по Маллори, $\times 100$

Fig. Results of staining using the Lie and Mallory methods in the hearts of rats.

A, B – primarily subendocardial localization of acute cardiomyocyte injury, C, D – primarily intramural localization of acute cardiomyocyte injury. A, B – Lie staining, C, D – Mallory staining, $\times 100$

Распределение чувствительности и специфичности метода окрашивания на аутопсийном и экспериментальном материале | Distribution of sensitivity and specificity of the staining methods on autopsy and experimental materials

Окрашивание/методы Staining/method	Аутопсийный материал Autopsy material		Экспериментальные модели Experimental models	
	чувствительность sensitivity, %	специфичность specificity, %	чувствительность sensitivity, %	специфичность specificity, %
Метод ГОФП НВФР	53,33	87,5%	96,88	92,31
Трихром по Маллори Mallory's trichrome	66,67	62,5	96,88	92,31

Обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что окрашивание по Маллори так же, как и по методу ГОФП, позволяет выявить фуксинофильный субстрат, указывающий на ишемическое контрактурное повреждение кардиомиоцитов различного происхождения, как на аутопсийном, так и на экспериментальном материале. Кардиомиоциты, положительно окрашенные по методу ГОФП, имеют красно-коричневый цвет на фоне интактного желтого, при окрашивании трихромом по Маллори – красно-оранжевый цвет на фоне пурпурно-фиолетового. На представленном нами аутопсийном материале окрашивание по методу ГОФП и трихромом по Маллори демонстрирует фуксинофилию, выраженную примерно в равной степени. Отмеченная нами несколько более высокая частота положительных результатов при окрашивании по Маллори требует дальнейшего статистического подтверждения. Оба метода при окрашивании аутопсийного материала при сравнении с экспериментальным находятся в границах низкой чувствительности диагностического теста. В экспериментальных моделях ишемического повреждения различного генеза наблюдается положительное гистохимическое окрашивание, обладающее высокой чувствительностью и специфичностью (96,88 и 92,31%, соответственно) и выраженное в равной степени для обоих методов.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что окрашивание трихромом по Маллори может служить дополнительным методом, уточняющим степень ишемических повреждений миокарда при исследовании аутопсийного и экспериментального материала. Для экспериментального материала этот метод более информативен, чем для аутопсийного. Метод Маллори помимо верификации ранней ишемии дает возможность оценить фиброзные изменения, характеризующие хроническую ишемию миокарда. При этом метод хорошо воспроизводим и доступен в ежедневной практике.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.С. Щекин, А.И. Лебедева, А.В. Самородов, Ю. Ванг.
Сбор и обработка материала – В.С. Щекин, А.И. Лебедева, А.В. Самородов, И.И. Терехулов, А.О. Власова, Р.Р. Загитов.
Написание текста – В.С. Щекин, А.И. Лебедева, И.И. Терехулов, С.А. Муслимов.
Редактирование – С.А. Муслимов, А.В. Самородов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.S. Shchekin, A.I. Lebedeva, A.V. Samorodov, Y. Wang.
Collected the data and performed the analysis – V.S. Shchekin, A.I. Lebedeva, A.V. Samorodov, I.I. Tereghulov, A.O. Vlasova, R.R. Zagitov.
Wrote the paper – V.S. Shchekin, A.I. Lebedeva, I.I. Tereghulov, S.A. Muslimov.
Edited the manuscript – S.A. Muslimov, A.V. Samorodov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Здравоохранение в России. Статистический сборник. Москва: Росстат, 2021. 171 с.
Healthcare in Russia. Statistical yearbook. Moscow: Rosstat, 2021. 171 p. (In Russ.).
- Патологическая анатомия: Национальное руководство / Под ред. М.А. Пальцева, Л.В. Кактурского, О.В. Зайратьянца. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1264 с.
Anatomic pathology: National guide / Ed. by MA Paltsev, LV Kaktursky, OV Zayratyants. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 1264 p. (In Russ.).
- Нуриманшин А.Ф., Богданов Р.Р., Хусаенова А.А. Периперационные особенности ведения пациентов при маммарокоронарном шунтировании с применением робот-ассистированной хирургической системы Da Vinci. Креативная хирургия и онкология. 2023;13(1):27–32. DOI: 10.24060/2076-3093-2023-13-1-27-32.
Nurimanshin AF, Bogdanov RR, Khusaenova AA. Perioperative patient management in mammarycoronary bypass surgery using Da Vinci surgical system. Creative surgery and oncology. 2023;13(1):27–32 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2023-13-1-27-32.

4. *Васильев Д.К., Руденко Б.А., Фещенко Д.А., Шукуров Ф.Б., Шаноян А.С.* Эндovasкулярное лечение пациента с многососудистым поражением в сочетании с хронической окклюзией правой коронарной артерии. Креативная хирургия и онкология. 2022;12(3):217–223. DOI: 10.24060/2076-3093-2022-12-3-217-223.
Vasiliev DK, Rudenko BA, Feshchenko DA, Shukurov FB, Shanoyan AS. Endovascular treatment of a patient with multivessel disease combined with chronic occlusion of the right coronary artery. Creative surgery and oncology. 2022;12(3):217–223 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2022-12-3-217-223.
5. *Харитонов Н.В., Вищукаев В.В., Трофимов Н.А., Макальский П.Д., Завгородний В.Н.* Особенности обеспечения гемодинамики во время хирургической реваскуляризации миокарда у пациентов с систолической дисфункцией левого желудочка. Креативная хирургия и онкология. 2021;11(3):228–234. DOI: 10.24060/2076-3093-2021-11-3-228-234.
Kharitonov NV, Vitsukaev VV, Trofimov NA, Makalsky PD, Zavgorodny VN. Haemodynamics support during surgical myocardial revascularisation in patients with systolic left ventricular dysfunction. Creative surgery and oncology. 2021;11(3):228–234 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2021-11-3-228-234.
6. *Валиева Р.А., Мультиановский Б.Л., Сибгатуллин Н.Г.* Аортокоронарное шунтирование у пациентов с рецидивирующей стенокардией после стентирования коронарных артерий. Креативная хирургия и онкология. 2021;11(3):260–264. DOI: 10.24060/2076-3093-2021-1-3-260-264.
Valieva RA, Multanovskiy BL, Sibgatullin NG. Aortocoronary bypass surgery in patients with recurrent post-coronary stenting angina. Creative surgery and oncology. 2021;11(3):260–264 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2021-1-3-260-264.
7. *Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T, Moretti M, Docquier M, Djonov V.* Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. Int J Legal Med. 2016;130(5):1265–80. DOI: 10.1007/s00414-016-1401-9.
8. *Коржевский Д.Э., Гиляров А.В.* Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. 95 с.
Korzhnevskiy DE, Gilyarov AV. Fundamentals of histological technique. Saint Petersburg: SpetsLit, 2010. 95 p. (In Russ.).
9. *Huang Y, Pan SS, Guo YP, Wang JY, Wan DF, Chen TR et al.* Comparison of myocardial ischemic/hypoxic staining techniques for evaluating the alleviation of exhaustive exercise-induced myocardial injury by exercise preconditioning. J Mol Histol. 2021;52(2):373–83. DOI: 10.1007/s10735-021-09958-0.
10. *van Reempts J, Borgers M, Reneman RS.* Early myocardial ischaemia: evaluation of the histochemical haematoxylin-basic fuchsin-picric acid (HBFP) staining technique. Cardiovasc Res. 1976;10(2):262–7. DOI: 10.1093/cvr/10.2.262.
11. *Zeitlin P, Segovia E, McNamara JJ.* Critical evaluation of the hematoxylin-basic fuchsin picric acid stain as an indication of early muscle ischemia. Hawaii Med J. 1974;33(2):65–9. PMID: 4131542.
12. *Rajs J, Jakobsen S.* Experiences with the hematoxylin basic fuchsin picric acid staining method for morphologic diagnosis of myocardial ischemia – an experimental study in forensic pathology. Forensic Sci. 1976;8(1):37–48. DOI: 10.1016/0300-9432(76)90045-5.
13. *Buğra A, Daş T.* The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of early myocardial infarction. Cureus. 2022;14(2):e22391. DOI:10.7759/cureus.22391.
14. *Резник А.Г.* Сравнительный анализ сократительной способности сердца при некоторых причинах смерти. Судебно-медицинская экспертиза. 2013;56(4):46–50. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=20193726> (получено 08.11.2024).
Reznik AG. The comparative analysis of cardiac contractility associated with certain causes of death. Forensic Medical Expertise. 2013;56(4):46–50 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=20193726> (accessed 08.11.2024).
15. *Lie JT.* Detection of early myocardial infarction by the acid fuchsin staining technic. Am J Clin Pathol. 1968;50(3):317–9. DOI: 10.1093/ajcp/50.3.317.
16. *Маркарян Н.М., Вандышева Р.А., Низяева Н.В., Гюева З.В., Михалев С.А., Хамошина М.Б. и др.* Клинико-морфологическая оценка рубцов на матке после кесарева сечения у пациенток с гинекологическими и экстрагенитальными заболеваниями. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(1):34–45. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.34-45.
Markaryan NM, Vandysheva RA, Nizyaeva NV, Gioeva ZV, Mikhalev SA, Khamoshina MB et al. Clinical and morphological assessment of uterine scars after cesarean section in patients with gynecological and extragenital diseases. Clinical and experimental morphology. 2023;12(1):34–45. DOI:10.31088/CEM2023.12.1.34-45.
17. *Сташкевич Д., Наумов А., Тимхина Н.* Метод перфузии изолированного сердца. Наука и инновации. 2012;12(118):66–69. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23926085> (получено 08.11.2024).
Stashkevich D, Naumov A, Timokhina N. Method of perfusion of an isolated heart. Science and Innovations. 2012;12(118):66–69 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23926085> (accessed 08.11.2024).
18. *Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA.* Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. Braz J Med Biol Res. 2002;35(11):1389–94. DOI: 10.1590/s0100-879x2002001100018.
19. *Авагимян А.А.* Влияние триметазида на энергетический баланс миокарда при химиотерапии доxorубицином и циклофосфамидом. Сибирский научный медицинский журнал. 2022;42(3):41–46. DOI: 10.18699/SSMJ20220304.
Avagimyan AA. Influence of trimetazidine on myocardium energy balance during chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide. Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal. 2022;42(3):41–46. (In Russ.). DOI: 10.18699/SSMJ20220304.

Информация об авторах

Влас Сергеевич Щекин – заведующий морфологической лабораторией Института фундаментальной медицины Башкирского государственного медицинского университета.

Юи Ванг – кандидат наук, профессор института фармации Ханчжоуского педагогического университета.

Анна Ивановна Лебедева – доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела морфологии всероссийского центра глазной и пластической хирургии «Аллоплант» Башкирского государственного медицинского университета.

Сагит Асхатович Муслимов – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник морфологической лаборатории Института фундаментальной медицины Башкирского государственного медицинского университета.

Ильдар Ильшатович Терегулов – младший научный сотрудник морфологической лаборатории Института фундаментальной медицины Башкирского государственного медицинского университета.

Ангелина Олеговна Власова – младший научный сотрудник морфологической лаборатории Института фундаментальной медицины Башкирского государственного медицинского университета.

Руслан Рустемович Загитов – ординатор кафедры патологической анатомии Башкирского государственного медицинского университета.

Александр Владимирович Самородов – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Башкирского государственного медицинского университета.

Author information

Vlas S. Shechekin – Head of the Laboratory of Morphology, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-2202-7071>

Yi Wang – PhD, Professor, Institute of Pharmacy, Hangzhou Normal University.

<https://orcid.org/0000-0001-9048-0092>

Anna I. Lebedeva – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Morphology, All-Russian Center for Ocular and Plastic Surgery “Alloplant”, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Sagit A. Muslimov – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Morphology, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9076-0251>

Ildar I. Teregulov – Junior Researcher, Laboratory of Morphology, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0005-0062-3763>

Angelina O. Vlasova – Junior Researcher, Laboratory of Morphology, Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0002-1818-5077>

Ruslan R. Zagitov – Resident, Department of Anatomic Pathology, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0004-3669-7660>

Aleksandr V. Samorodov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology with the Course of Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-9302-499X>

Секционное наблюдение спорадической болезни Крейтцфельда–Якоба

Д.Ф. Галбацов¹, М.Б. Борисенко², Н.Н. Соловьев³, А.М. Емелин², Р.В. Деев²

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ ФГБУЗ Клиническая больница № 51 ФМБА России, Железнодорожск, Россия

Резюме. Введение. Болезнь Крейтцфельда–Якоба – нейродегенеративное заболевание с неизбежным летальным исходом, обусловленное отложением в нейронах прионного белка, устойчивого к протеазам клеток человека. Клинически проявляется полиморфными неврологическими симптомами, прогрессирующей деменцией, нарушением актов дыхания и глотания. Летальный исход наступает через 6–12 месяцев. При посмертном гистологическом исследовании определяются губчатая дегенерация коры головного мозга, нейронофагия, бляшки амилоидоподобного белка. Представлен случай болезни Крейтцфельда–Якоба с описанием выявленных характерных изменений при гистологическом исследовании ткани головного мозга.

Материалы и методы. В качестве материалов использовались медицинская документация, фрагменты головного мозга в парафиновых блоках из следующих локализаций: хвостатые ядра справа и слева, скорлупа справа и слева, лобная доля справа и слева, височная и теменная доли слева. Методы включали анализ медицинской документации, изучение препаратов головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, толуидиновым синим или при помощи иммуногистохимических реакций с антителами к основному белку миеллина, глияльному фибриллярному кислому белку и CD68.

Результаты. У пациента в момент манифестации заболевания были выявлены характерные симптомы болезни Крейтцфельда–Якоба: сенсомоторная афазия, атаксия, тремор, диплопия и прогрессирующие когнитивные нарушения. При визуализации с помощью магнитно-резонансной томографии обнаружены патологическая интенсивность сигнала от головок хвостатых ядер, очаги глиоза и атрофия лобно-теменных областей. При электроэнцефалографии зарегистрированы комплексы типа острая волна–медленная волна. Микроскопически определялись губчатая дегенерация белого вещества головного мозга, участки выпадения нейронов, нейронофагия, реактивный астроцитоз, признаки демиелинизации, активация микроглии, тигролиз вещества Ниссля. Лимфоцитарная инфильтрация не определялась.

Заключение. На основании клинической картины, изменений на ЭЭГ и МРТ и гистологических признаков пациенту был поставлен диагноз «спорадическая болезнь Крейтцфельда–Якоба».

Ключевые слова: болезнь Крейтцфельда–Якоба, прионные болезни, клинический случай, морфологические признаки

Для корреспонденции: Марина Борисовна Борисенко. E-mail: marina-borisenko-2000@mail.ru

Для цитирования: Галбацов Д.Ф., Борисенко М.Б., Соловьев Н.Н., Емелин А.М., Деев Р.В. Секционное наблюдение спорадической болезни Крейтцфельда–Якоба. Клинический экспериментальная морфология. 2025;14(3):80–85. DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.80-85.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 28.10.2024. Получена после рецензирования 18.11.2024. Принята в печать 17.02.2025.

Autopsy observations of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

D.F. Galbatsov¹, M.B. Borisenko², N.N. Soloviev³, A.M. Emelin², R.V. Deev²

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

³ Clinical Hospital No. 51, Zheleznogorsk, Russia

Abstract. Introduction. Creutzfeldt-Jakob disease is a fatal neurodegenerative disorder caused by deposited prion protein in neurons, which is resistant to human cell proteases. This disease manifests as polymorphic neurological symptoms, progressive dementia, and impaired breathing and swallowing. The fatal outcome

is observed within 6–12 months. Postmortem morphological examination reveals spongiform degeneration of brain tissue, neuronophagia, and amyloid-like protein conglomerates. This paper describes characteristic changes identified on histological examination of brain tissue of a patient with Creutzfeldt-Jakob disease.

Materials and methods. We analyzed medical records and the following brain fragments: left and right caudate nuclei, left and right putamen, left and right frontal lobes, left parietal lobe, and left temporal lobe. The paraffin-embedded brain samples were stained with hematoxylin and eosin, toluidine blue, or immunohistochemical reactions with antibodies to myelin basic protein, glial fibrillary acidic protein, and CD68.

Results. Characteristic symptoms were identified from the onset of the disease, including sensorimotor aphasia, ataxia, tremor, diplopia, and progressive cognitive decline. MRI revealed increased signal intensity from the heads of the caudate nuclei, foci of gliosis, and atrophy of the frontoparietal lobes. EEG showed sharp-wave discharges. Microscopic examination revealed spongiform degeneration of the white matter, areas of neuronal loss, microglial neuronophagia, reactive astrocytosis, signs of demyelination, and tigrolysis of Nissl matter. Lymphocytic infiltration was not detected.

Conclusion. Based on the clinical picture, changes in EEG and MRI, and histological signs, the patient was diagnosed with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Keywords: Creutzfeldt-Jakob disease, prion diseases, clinical case, morphological features

Corresponding author: Marina B. Borisenko. E-mail: marina-borisenko-2000@mail.ru

For citation: Galbatsov D.F., Borisenko M.B., Soloviev N.N., Emelin A.M., Deev R.V. Autopsy observations of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Clin. exp. morphology. 2025;14(3):80–85 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.3.80-85.

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

Received 28.10.2024. Received in revised form 18.11.2024. Accepted 17.02.2025.

Введение

Спорадический тип болезни Крейтцфельда–Якоба (БКЯ) представляет собой контагиозное нейродегенеративное заболевание, неизбежно ведущее к летальной форме исходу, и считается наиболее распространенной формой прионных патологий человека, составляя до 90% случаев с заболеваемостью от 1,5 до 2,0 на 1 миллион человеко-лет. Поражает преимущественно мужчин старше 60 лет [1].

Нормальный прионный белок является гликопротеином, включенным в структуру клеточной мембраны, и широко представлен в клетках нервной системы и лимфоцитах [2]. Предполагается участие прионного белка в гомеостазе и дифференцировке нейронов, клеточной адгезии, формировании синапсов, передаче межклеточных сигналов, направлении роста аксонов, нейропротекции, регуляции циркадных ритмов [3]. Вне центральной нервной системы прионный белок способствует поддержанию синтеза миелина и регулирует функционирование лимфоцитов [4].

Этиологическим фактором для прионных болезней выступает клеточный прионный белок (PrP^c), который в результате конформационных изменений приобретает β-складчатую структуру и становится резистентным к протеазам клеток человека, образуя тип *scrapie isoform of the prion protein (PrP^{Sc})*, что позволяет ему формировать амилоидоподобные нерастворимые структуры в клетках [5]. Ятрогенная передача контагиозных прионов в медицинской практике возможна при использовании хирургических инструментов, загрязненных частицами нервной ткани доноров, инфицированных

прионами, вызывающими БКЯ, при трансплантации твердой мозговой оболочки, переливании продуктов крови и использовании гормонов роста, полученных из гипофиза [1].

Целью настоящего исследования является описание случая прижизненной диагностики и посмертного гистологического исследования головного мозга пациента с БКЯ.

Материалы и методы

В качестве материалов использовались медицинская документация, фрагменты головного мозга в парафиновых блоках из следующих локализаций: хвостатые ядра справа и слева, скорлупа справа и слева, лобная доля справа и слева, височная и теменная доли слева. Методы включали анализ медицинской документации, исследование препаратов головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, толуидиновым синим, а также при помощи иммуногистохимических (ИГХ) реакций с антителами к основному белку миелина (myelin basic protein, MBP), глияльному фибриллярному кислому белку (GFAP) и CD68.

Клиническое наблюдение

Пациент С., 60 лет, в январе 2022 года обратился к неврологу с жалобами на расстройство речи, изменение походки, координации движений, нарушения зрения и онемение правой нижней конечности. Первые неврологические симптомы появились в 2021 году, в связи с чем пациент был экстренно госпитализирован с диагнозом «острое нарушение мозгового

кровообращения». Проведены компьютерная томография (КТ) и КТ-ангиография, по данным которых признаки нарушения мозгового кровообращения не выявлены.

При первичном неврологическом осмотре (19.01.2022) пациент сохранял вербальный контакт, но было отмечено изменение речи по типу сенсомоторной афазии, нарушения зрения объективно расценены как горизонтальный нистагм, нарушения координации движений наблюдались по типу атаксии, неустойчивости в позе Ромберга, а также дисметрии и интенционного тремора билатерально при проведении пальце-носовой пробы. Когнитивные изменения затруднили оценку пяточно-коленной пробы. Нарушения чувствительности, менингеальные знаки, изменения мышечного тонуса не отмечены.

При проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) среди характерных признаков БКЯ выявлены повышенная интенсивность сигнала от головок хвостатых ядер и очаги глиоза в белом веществе больших полушарий, атрофия вещества головного мозга проявлялась расширением конвексимального и субарахноидального пространств вокруг лобных и теменных долей.

В заключении электроэнцефалографии (ЭЭГ) указаны значительные диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга, преобладание медленной активности в разных отведениях, билатерально-синхронная пароксизмальная активность в виде острых волн и групп медленных волн, комплексы типа острая волна–медленная волна, более выраженные в лобно-центральных и центрально-теменных отведениях слева.

Для исключения паранеопластических процессов проведено исследование плазмы на наличие антинейронных антител (Анти-Yo1, Nu, Ri, PNMA2 (Ma2/Ta), CV2, амфифизин), которые не были выявлены.

При повторном осмотре неврологом (25.01.2022) дополнительно выявлены жалобы на судороги в конечностях, головокружение, лабильность артериального давления. Была назначена симптоматическая терапия.

В связи с прогрессированием неврологической симптоматики 8 февраля 2022 года пациент был экстренно госпитализирован в отделение анестезиологии и реанимации в тяжелом состоянии. 16 марта 2022 года пациент скончался на фоне развития двусторонней пневмонии.

Исследование одобрено этическим комитетом Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (протокол № 9 от 25.10.2024).

Результаты

Макроскопически при исследовании головного мозга обнаружено, что извилины уплощены, борозды сглажены, основание мозга уплощено, в области полушарий мозжечка глубокие борозды от вдавления в большое затылочное отверстие.

При гистологическом исследовании выявлены следующие изменения в ткани головного мозга: нейроны коры дистрофически изменены, гиперхромны, часть нейронов набухшая или в виде клеток-теней, наблюдаются нейронофагия фагоцитирующими клетками микроглии; встречаются зоны отсутствия нейронов (рис. А). Реакция с антителами к МВР демонстрирует демиелинизацию как следствие нейродегенерации при прионной патологии ЦНС. Исследование ткани головного мозга с антителами к GFAP указывает на развитие компенсаторной пролиферации астроцитов (рис. В1, В2, С).

Проведено ИГХ исследование с идентификацией CD68+ клеток микроглии и определена инфильтрация фагоцитирующими клетками глии. Окрасивание толуидиновым синим визуализирует тигролиз вещества Ниссля и вакуолизацию цитоплазмы нейронов (рис. D1–D3).

Обсуждение

Клиническая картина болезни Крейтцфельда–Якоба включает полиморфную неврологическую симптоматику с быстро прогрессирующим течением, что приводит к угнетению когнитивных и поведенческих функций и клинически проявляется деменцией [6]. У пациентов стремительно развиваются мультифокальные неврологические дефициты, например нарушения зрения, и различные двигательные расстройства, такие как миоклонус, дистония, атетоз, тремор и экстрапирамидные поражения, в терминальной стадии наблюдается акинетический мутизм [7]. Наиболее частой причиной смерти является аспирационная пневмония. Тем не менее манифестная форма болезни сходна с другими нейродегенеративными заболеваниями, которые сопровождаются деменцией (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сосудистая деменция) [8], в результате чего диагностирование болезни Крейтцфельда–Якоба зачастую становится диагнозом исключения.

В представленном случае у пациента клиническая симптоматика была полиморфной и включала моторные, сенсорные и когнитивные нарушения, что свидетельствует о диффузном поражении нервной системы. Аспирационная пневмония, которая стала причиной смерти пациента, сопровождается нейродегенеративными заболеваниями, в частности спорадическую болезнь Крейтцфельда–Якоба [9].

Патологические изменения поражают разные отделы головного мозга: неокортекс, стриатум, таламус и кору мозжечка, в меньшей степени повреждаются бледный шар, гиппокамп и зубчатая извилина, ствол мозга и спинной мозг [10]. В ткани головного мозга развивается распространенная губчатая дегенерация с крупными сливающимися вакуолями разного размера в белом и сером веществе коры головного мозга, наблюдаются бляшки амилоидоподобного белка, которые расположены перичеллюлярно и периваскулярно [10].

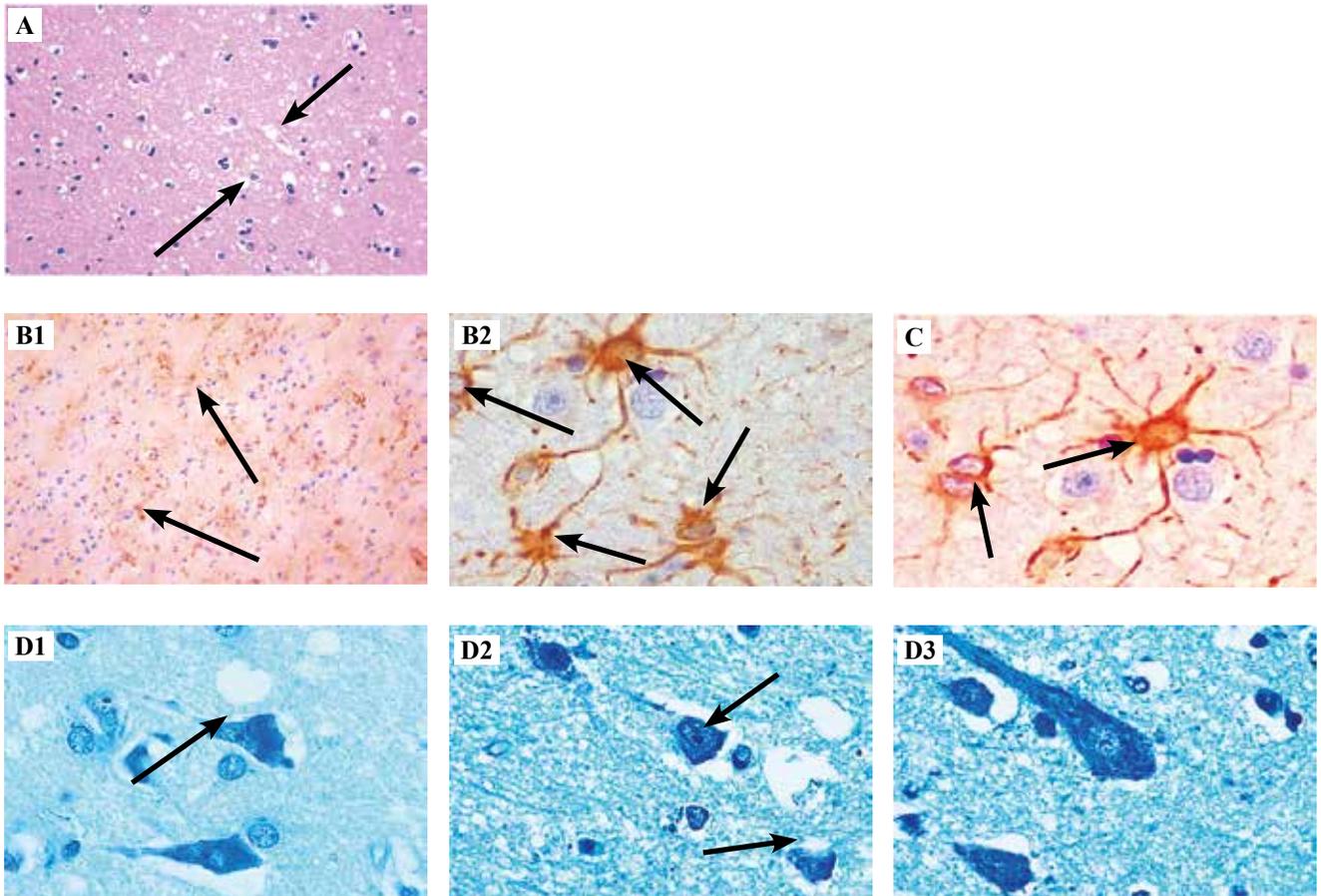


Рис. Микроскопические характеристики головного мозга у пациента с болезнью Крейтцфельда–Якоба.

A – губкообразная дегенерация коры головного мозга в виде мелких пустых вакуолей разного размера (*стрелки*). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

B1, B2, C – реактивный астроцитоз (*стрелки*). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к GFAP. B1 – $\times 200$, B2, C – $\times 400$.

D1, D2, D3 – тигролиз вещества Ниссля и вакуолизация нейронов (*стрелки*). Окраска толуидиновым синим по Ниссля, $\times 400$.

Fig. Microscopic characteristics of the brain in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease.

A – spongiform degeneration of the cerebral cortex as small empty vacuoles of various sizes (*arrows*). H&E stain, $\times 200$.

B1, B2, C – reactive astrocytosis (*arrows*). IHC assay with antibodies to GFAP. B1 – $\times 200$, B2, C – $\times 400$.

D1, D2, D3 – tigrolysis of Nissl substance and neuronal vacuolation (*arrows*). Nissl toluidine blue stain, $\times 400$.

При окрашивании гематоксилином и эозином в исследуемом фрагменте головного мозга выявлена губчатая дегенерация головного мозга.

Нейродегенеративные изменения не являются специфическими, однако участвуют в патогенезе психических нарушений и характеризуются прогредиентным течением. Также при нейродегенерации наблюдается демиелинизация, которая проявляется накоплением в виде агрегатов вокруг нейронов и клеток глии основного белка миелина. При цитогистохимическом исследовании с антителами к МВР препарата головного мозга пациента выявлены изменения различных участков ткани головного мозга вследствие массивной гибели нейронов и последующего ауто-

лиза. Обнаружено патологическое накопление МВР в цитоплазме нейронов и перинейронально как признак демиелинизации [8].

В результате гибели большого числа нейронов активируется процесс замещения, что проявляется реактивным астроцитозом [10]. При ИГХ исследовании с антителами к GFAP препарата головного мозга пациента выявлен репаративный глиоз с разрастанием астроцитов.

Воспаление и лимфоцитарная инфильтрация несвойственны прионным болезням, однако при них наблюдается активация макрофагов как показатель возбуждения микроглии [10]. При ИГХ исследовании с антителами к CD68 препарата головного мозга па-

циента обнаружена воспалительная инфильтрация, представленная клетками микроглии.

В этом клиническом случае характерные нейродегенеративные изменения наблюдались во всех участках мозга, которые были взяты на аутопсии для гистологического исследования, а именно в хвостатых ядрах, скорлупе, коре лобных долей, теменной и височной доле. Данные результаты частично совпадают с исследованием F.Ö. Atalay et al., в котором изменения были выявлены в коре больших полушарий и полосатом теле, таламусе и коре мозжечка [10].

Схожие изменения в клиническом случае, описанном P. Salehi et al., затрагивали кору больших полушарий, головки хвостатых ядер и скорлупу [7]. Подобные локализации губкообразной дегенерации коры во многом обуславливают полиморфизм клинической симптоматики.

Таким образом, морфологическое исследование является ключевым в диагностике БКЯ и позволяет выявить признаки повреждения ткани головного мозга в результате патологического накопления прионов. Биопсия головного мозга при подозрении на БКЯ с наличием характерной клинической и инструментальной картины не проводится, так как не влияет на жизненный прогноз у таких пациентов [7]. Клиническая картина, лабораторные и инструментальные исследования являются вспомогательными [7].

Заключение

Прионные заболевания встречаются в клинической практике редко и трудны для диагностики из-за полиморфной клинической картины. Однако сочетание клинической картины – двигательных и чувствительных расстройств, афазии и нарушения зрения – с типичными изменениями на ЭЭГ и МРТ и характерными гистологическими признаками, которые включают губчатую дегенерацию коры головного мозга, признаки тигролиза вещества Ниссля, реактивный астроцитоз, демиелинизацию и активацию микроглии, позволяют поставить диагноз «спорадическая болезнь Крейтцфельдта–Якоба». На данный момент не разработаны эффективные методы лечения, а низкая клиническая настроенность дает возможность установить диагноз зачастую в терминальной стадии заболевания. Диагностика болезни Крейтцфельдта–Якоба имеет значение для разработки методов профилактики передачи прионного белка как возбудителя инкурабельного заболевания. В представленном случае болезнь Крейтцфельдта–Якоба была выявлена в терминальной стадии, а симптоматическая цитопротективная терапия не имела эффекта.

Информация об авторах

Джамал Фадиевич Галбацов – ординатор первого года обучения Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.
Марина Борисовна Борисенко – ординатор первого года обучения НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Р.В. Деев, А.М. Емелин.
Сбор и обработка материала – М.Б. Борисенко, Д.Ф. Галбацов, Н.Н. Соловьев.

Написание текста – М.Б. Борисенко, Д.Ф. Галбацов.

Редактирование – Р.В. Деев, А.М. Емелин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – R.V. Deev, A.M. Emelin.

Collected the data and performed the analysis – M.B. Borisenko, D.F. Galbatsov, N.N. Soloviev.

Wrote the paper – M.B. Borisenko, D.F. Galbatsov.

Edited the manuscript – R.V. Deev, A.M. Emelin.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Hermann P, Appleby B, Brandel JP, Caughey B, Collins S, Geschwind MD et al. Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol.* 2021; 20(3):235–46. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30477-4.
- Keller A, Nuvolone M, Abakumova I, Chincisan A, Reimann R, Avar M et al. Prion pathogenesis is unaltered in a mouse strain with a permeable blood-brain barrier. *PLoS Pathog.* 2018;14(11):e1007424. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007424.
- Baldwin KJ, Correll CM. Prion disease. *Semin Neurol.* 2019; 39(4):428–39. DOI: 10.1055/s-0039-1687841.
- Manni G, Lewis V, Senesi M, Spagnolli G, Fallarino F, Collins SJ et al. The cellular prion protein beyond prion diseases. *Swiss Med Wkly.* 2020;150:w20222. DOI: 10.4414/sm.w.2020.20222.
- Fiorini M, Bongianini M, Monaco S, Zanusso G. Biochemical characterization of prions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;150:389–407. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.06.012.
- Mead S, Rudge P. CJD mimics and chameleons. *Pract Neurol.* 2017;17(2):113–21. DOI: 10.1136/practneurol-2016-001571.
- Salehi P, Clark M, Pinzon J, Patil A. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Emerg Med.* 2022;52:267.e1–3. DOI: 10.1016/j.ajem.2021.07.038.
- Frid K, Einstein O, Friedman-Levi Y, Binyamin O, Ben-Hur T, Gabizon R. Aggregation of MBP in chronic demyelination. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(7):711–21. DOI: 10.1002/acn3.207.
- Ciolac D, Racila R, Duarte C, Vasileva M, Manea D, Gorincioi N et al. Clinical and radiological deterioration in a case of Creutzfeldt–Jakob disease following SARS-CoV-2 infection: hints to accelerated age-dependent neurodegeneration. *Biomedicine.* 2021;9(11):1730. DOI: 10.3390/biomedicine9111730.
- Atalay FÖ, Tolunay Ş, Özgün G, Bekar A, Zarifoğlu M. Creutzfeldt-Jakob disease: report of four cases and review of the literature. *Turk Patoloji Derg.* 2015;31(2):148–52. DOI: 10.5146/tjpath.2013.01195.

Николай Николаевич Соловьев – врач-патологоанатом клинической больницы № 51.

Алексей Михайлович Емелин – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Роман Вадимович Деев – кандидат медицинских наук, доцент, первый заместитель директора НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Jamal F. Galbatsov – 1st-year Resident, S.M. Kirov Military Medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0002-7328-7503>

Marina B. Borisenko – 1st-year Resident, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0002-2684-2017>

Nikolay N. Soloviev – Pathologist, Clinical Hospital No. 51.

<https://orcid.org/0009-0008-0554-5700>

Aleksei M. Emelin – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-4109-0105>

Roman V. Deev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, First Deputy Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>

Мемориальная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика Н.К. Пермякова

Memorial conference on 100th birth anniversary of Academician Nikolay Permyakov

25 февраля 2025 года в НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» прошла мемориальная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика РАМН, Заслуженного деятеля науки РСФСР, лауреата Государственной премии СССР Николая Константиновича Пермякова. В конференции приняли участие ученики, соратники и последователи школы Николая Константиновича, члены Российской академии наук, коллеги из субъектов Российской Федерации (Челябинск, Новосибирск, Ростов-на-Дону, Владикавказ).

Открыл конференцию директор ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» академик РАН Константин Валентинович Котенко, который в своем выступлении отметил огромный вклад Николая Константиновича Пермякова в развитие и сохранение НИИ морфологии человека РАМН в трудное для нашей страны время. С приветственным словом к участникам конференции обратились заместитель академика-секретаря отделения медицинских наук РАН академик РАН В.В. Береговых и директор НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского член-корреспондент РАН С.С. Петриков.

Развернутый доклад о жизни и научном творчестве Н.К. Пермякова сделала директор НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» член-корреспондент РАН Л.М. Михалева.

Николай Константинович Пермяков родился 25 февраля 1925 года в Саратовской губернии. В 1943 году, едва достигнув совершеннолетия, ушел из 4-го Московского медицинского института на фронт, а после войны вернулся к учебе, в 1948 году с отличием окончил

1-й Московский ордена Ленина медицинский институт и поступил в аспирантуру на кафедру судебной медицины, руководимую А.В. Русаковым. Николай Константинович, будучи профессионалом с энциклопедическими знаниями, сочетал в своем лице как врача-патологоанатома, так и судебного медика.

В 1951 году он стал сотрудником МНИИ имени Н.В. Склифосовского, где проработал до конца жизни, возглавив с 1962 года патологоанатомическое отделение. С 1988 года Николай Константинович совмещал работу в МНИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского с должностью директора НИИ морфологии человека РАМН, а с 1991-го заведовал кафедрой патологической анатомии факультета послевузовского профессионального образования Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова (в настоящее время Первый московский государственный медицинский институт имени И.М. Сеченова Минздрава России, Сеченовский университет).

В 1951 году Н.К. Пермяков блестяще защитил кандидатскую диссертацию на тему «Изменения в почках при гемолизе», а в 1959-м – докторскую на тему «Общая гнойная инфекция после аборта». В 1984 году его избрали членом-корреспондентом, а в 1988 году – действительным членом Академии медицинских наук СССР (впоследствии РАМН). Н.К. Пермяков опубликовал более 270 научных работ, в том числе семь монографий. Под его руководством защищены 37 кандидатских и 14 докторских диссертаций. Основные научные разработки Николая Константиновича посвящены патологической анатомии гнойных инфекций, сепсиса, патологии экстремальных состояний, реанимационной патологии, наркозной смерти, ятрогениям, ДВС-синдрому. В 1975 году ему было присвоено звание Заслуженного деятеля науки РСФСР, в 1984 году –





почетное звание лауреата Государственной премии СССР. Кроме того, Н.К. Пермякову присуждены премии АМН СССР имени А.И. Абрикосова (1983) и имени И.В. Давыдовского (1985).

В докладе отмечалась активная научно-общественная деятельность Николая Константиновича, который являлся председателем Московского общества патологоанатомов, председателем диссертационного совета при НИИ морфологии человека РАМН, членом бюро отделения медико-биологических наук РАМН, пленума ВАК, Ученого медицинского совета при Департаменте здравоохранения правительства Москвы, состоял в редакционной коллегии журнала «Архив патологии» и был заместителем редактора отдела патологической анатомии Большой медицинской энциклопедии.

Деятельность Николая Константиновича Пермякова в НИИ морфологии человека РАМН пришлась на очень трудные 1990-е – годы политической и экономической нестабильности, инфляции, нарушения финансирования учреждений, задержки заработной платы. В этот нелегкий период Н.К. Пермяков сохранил институт благодаря тому, что рассредоточил ряд лабораторий по разным клиническим базам (МНИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 2 ДЗМ», Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31 имени академика Г.М. Савельевой ДЗМ», НИИ пульмонологии ФМБА России). Каждая из этих баз стала новой точкой роста патологической анатомии.

Николай Константинович ушел из жизни 19 апреля 1999 года на 75-м году жизни. Он навсегда останется

в нашей памяти великим учителем, создавшим большую научную школу патологоанатомов.

В первой части конференции прозвучали доклады учеников и представителей РАН: А.А. Каниболоцкий «Патологическая анатомия и судебная медицина в НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского и институте морфологии человека: совместный путь, роль академика Н.К. Пермякова», Г.П. Титова «Проблемы неотложной гастроэнтерологии в трудах Н.К. Пермякова», Г.А. Платонова «Патологическая анатомия неокклюзионных инфарктов кишки», Г.А. Нефедова «Проблемы влияния современных методов лечения на патогенез неотложных заболеваний в трудах Н.К. Пермякова», И.В. Барина «Клинико-анатомические особенности пролонгированных форм тромбозов легочных артерий». Завершила первое пленарное заседание М.Ю. Шахина докладом на тему «Клинико-анатомические особенности инфаркта миокарда в старческом возрасте».

Во время перерыва гости имели возможность познакомиться с современной техникой, предназначенной для работы врачей-патологоанатомов, научных сотрудников в области патологической анатомии и клеточной биологии, а также задать вопросы представителям компаний «Лабтех», «БиоВитрум» и «БиоЛайн».

На втором пленарном заседании были заслушаны выступления коллег из субъектов Российской Федерации: Е.Л. Казачков (Челябинск) представил работу «Клинико-морфологическое обоснование хирургической тактики при фолликулярных опухолях щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала», А.П. Надеев (Новосибирск) выступил с сообщением «Ятрогенные состояния и внезапная смерть при материнской смертности». О.В. Воронова





(Ростов-на-Дону) осветила основные аспекты современной хирургии, преломленные к деятельности патологоанатома. Вторая половина пленарного заседания была отведена молодым ученым, преемникам идей Н.К. Пермякова и его учеников. К.Ю. Мидибер ознакомил участников конференции с редким наблюдением из практики – идиопатическим кистозным медионекрозом Эрдгейма у беременных. А.И. Еремина осветила проблему патологической анатомии внезапной сердечной смерти. На этом заседании также были доложены основные результаты выполняемых в институте диссертационных исследований: «Клинико-морфологические особенности различных вариантов течения дивертикулярной болезни толстой кишки» (А.К. Конюкова) и «Морфологические изменения ушек сердца при фибрилляции предсердий» (Н.А. Гутырчик).

В завершение конференции с воспоминаниями выступили ученики и соратники Николая Константиновича Пермякова – профессор С.В. Савельев, профессор А.Л. Черняев, кандидат медицинских наук А.А. Епихиев, член-корреспондент РАН Л.В. Кактурский. От лица молодого поколения последователей Николая Константиновича выступил кандидат медицинских наук К.Ю. Мидибер, который выразил отношение научной молодежи к наследию великого ученого следующими словами: «В силу обстоятельств мы не имеем возможности сегодня работать с Николаем Константиновичем, но у нас есть уникальная возмож-

ность перенимать опыт у его учеников, которые чтут заложенные им научные идеи и являются последователями его патологоанатомической школы».

Проведенная мемориальная конференция произвела большое впечатление на всех участников – она не только носила академический характер, но и в очередной раз напомнила всем о наших великих учителях, которые в лучших традициях отечественной науки не жалели сил и энергии в передаче знаний научной молодежи.

*А.С. Конторицков,
научный сотрудник лаборатории клинической
морфологии НИИ морфологии человека
им. акад. А.П. Авцына
РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского,*

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

*Л.В. Кактурский,
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН, научный руководитель
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына
РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского*