

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
При поддержке Российского общества патологоанатомов

№ 2 | 2019 | Том 8

ISSN 2226-5988 (print)
ISSN 2686-6749 (online)

**«Клиническая
и экспериментальная
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность 4 раза в год

Основан в 2011 году

Включен в перечень ВАК

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

Учредитель

ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт
морфологии человека»

117418, Москва,
ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции

117418, Москва, ул. Цюрупы,
д. 3

Телефоны +7 (499) 120-13-34
+7 (499) 128-87-01

e-mail: sem.journal@mail.ru

www.sem-journal.ru

www.morpholhum.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство
«Группа МДВ»
www.mdv-group.ru

Подписные индексы:

70045 по каталогу агентства
«Роспечать»

70045 по каталогу «Урал-Пресс»

Свидетельство о регистрации
средства массовой информации
ПИ № ФС77-47183
от 2 ноября 2011 года.

© ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт
морфологии человека»

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

Большакова Г.Б., доктор биол. наук,
Москва, Россия

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

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

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

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

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

Кушлинский Н.Е., член-корр. РАН, доктор
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Марков И.И., доктор мед. наук,
профессор, Самара, Россия

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

Михалева Л.М., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Никитюк Д.Б., член-корр. РАН, доктор
мед. наук, профессор, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

Туркина Е.В., кандидат биол. наук, доцент,
Чарльстон, США

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

Доросевич А.Е., доктор мед. наук,
профессор, Смоленск, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

Черников В.П., кандидат мед. наук,
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

№ 2 | 2019 | Volume 8

ISSN 2226-5988 (print)
ISSN 2686-6749 (online)

«Clinical
and Experimental
Morphology»

SCIENTIFIC AND PRACTICAL
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 4 issues per year

Founded in 2011

Listed in Higher Attestation
Commission (Vysshaya
Attestatsionnaya Komissiya,
VAK), presented in the RSCI
database (Russian Science
Citation Index)

Journal founder

FSBSI «Research Institute
of Human Morphology»

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

Editorial office address

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

Tel. +7 (499) 120-13-34
+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morfolhum.ru

Edition of 500 copies

Publisher

„Gruppa MDV“
www.mdv-group.ru

Subscription index:

70045 according to the
„Rospechat“ Agency catalog

70045 according to the
„Ural-Press“ catalog

The mass media registration
certificate ПИ № ФС77-47183
dated November 2, 2011

Editor-in-chief

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

Deputies editor-in-chief

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

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

Executive secretary

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

Editorial board

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

Alekseeva Natalia T., Dr.Sci.Med., Professor,
Voronezh, Russia

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

Banin Victor V., Corresponding Member of
the RAS, Dr.Sci.Med., Professor, Moscow,
Russia

Bolshakova Galina B., Dr.Sci.Biol., Moscow,
Russia

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

Chernyaev Andrey L., Dr.Sci.Med., 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

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

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

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

Markov Igor I., Dr. Sci. Med., Professor,
Samara, Russia

Mikhaleva Lyudmila M., Dr.Sci.Med.,
Professor, Moscow, Russia

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

Nikityuk Dmitriy B., Corresponding Member
of the RAS, Dr.Sci.Med., Professor, Moscow,
Russia

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

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

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

Rogov Yuri I., Cand.Sci.Med., Associate
Professor, Minsk, Republic of Belarus

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

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

Turkina Elena V., Cand.Sci.Med., Associate
Professor Charleston, USA

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

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

Editorial Review Board

Chernikov Valeriy P., Cand.Sci.Med.,
Moscow, Russia

Dorosevich Alexandr E., Dr.Sci.Med.,
Professor, Smolensk, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Т.В. Шмакова, Е.Ю. Кананыхина, Г.Б. Большакова*
Клеточные механизмы безрубцового заживления
кожи млекопитающих 5 *T.V. Shmakova, E.Yu. Kananykhina, G.B. Bolshakova*
Cellular mechanisms of scarless wound healing
in mammals
- А.А. Грядунова, Е.А. Буланова, Е.В. Кудан,
Ф.Д.А.С. Перейра, Ю.Д. Хесуани, В.А. Миронов*
Масштабируемая биофабрикация
и морфологическая оценка тканевых сфероидов 12 *A.A. Gryadunova, E.A. Bulanova, E.V. Koudan,
F.D.A.S. Pereira, Yu.D. Khesuani, V.A. Mironov*
Scalable biofabrication and morphology evaluation
of tissue spheroids

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

- А.К. Александрова, В.А. Смольяникова*
К вопросу о морфологических особенностях
себорейного кератоза 21 *A.K. Alexandrova, V.A. Smolyannikova*
On the question of morphological features of
seborrheic keratosis
- И.А. Иванов, А.В. Асатурова, Г.Е. Чернуха,
М.Р. Думановская, М.В. Мнихович*
Роль патологического неоангиогенеза
в формировании полипов эндометрия
и механизмы возникновения аномальных
маточных кровотечений 28 *I.A. Ivanov, A.V. Asaturova, G.E. Chernukha,
M.R. Dumanovskaya, M.V. Mnikhovich*
The role of pathological angiogenesis in endometrial
polyp pathogenesis
and abnormal uterine bleeding
- М.В. Шамаракова, А.В. Асатурова*
Исследование маркеров эпителиально-
мезенхимального перехода,
ангиогенеза и натуральных киллеров
в пограничных опухолях яичников
беременных женщин 35 *M.V. Shamarakova, A.V. Asaturova*
Evaluation of epithelial-mesenchymal transition,
angiogenesis and natural killers markers in borderline
ovarian tumors in pregnant women
- С.В. Емельянчик, О.А. Карнюшко, С.М. Зиматкин*
Состояние митохондрий в клетках Пуркинье
мозжечка крысы при холестазае 41 *S.V. Emelyanchik, O.A. Karnyushko, S.M. Zimatkin*
The state of mitochondria in cerebellum Purkinje cells
of rats with cholestasis

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова,
В.В. Яглов, Е.П. Тимохина
Транскрипционная регуляция морфогенетических
процессов в клубочковой зоне коркового вещества
надпочечников крыс в постнатальном периоде
онтогенеза

48

S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, S.V. Nazimova,
V.V. Yaglov, E.P. Timokhina
Transcriptional regulation of morphogenesis of rat
adrenal zona glomerulosa
during postnatal development

А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева,
Г.А. Давыдова, А.Н. Шевцов, И.И. Селезнева,
С.В. Павлович, Н.А. Пульвер, Е.А. Раскина,
А.В. Волков, А.С. Сундеев, С.Г. Путилин,
И.В. Савинцева, Г.Т. Сухих
Применение срезов органных внеклеточных
матриц для 3D культивирования

55

A.Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva,
G.A. Davydova, A.N. Shevtsov, I.I. Selezneva,
S.V. Pavlovich, N.A. Pulver, E.A. Raskina, A.V. Volkov,
A.S. Sundeev, S.G. Putilin, I.V. Savintseva, G.T. Sukhikh
Application of precision cut organ extacellular matrix
slices for 3D cultivation

ЮБИЛЕИ

Анна Георгиевна Бабаева
(к 90-летию со дня рождения)

64

Вячеслав Семенович Пауков
(к 85-летию со дня рождения)

66

ХРОНИКА

XI пленум Российского общества
патологоанатомов

69

Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих

Т.В. Шмакова¹, Е.Ю. Кананыхина^{1,2}, Г.Б. Большакова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

В обзоре рассматриваются основные этапы заживления кожных ран млекопитающих и их особенности на моделях безрубцового или минимального заживления (ранние плоды млекопитающих, иглистые мыши *Acomys*, слизистая оболочка полости рта, рана на животе крыс).

Более глубокое изучение каскада событий, которые сопровождают заживление ран, в частности факторов, обуславливающих минимизацию кожного рубца или его отсутствие, помогут лучше понять процессы регенерации как на клеточном, так и на молекулярном уровне, что может быть использовано для развития направленной регенерации утраченных кожных структур.

Ключевые слова: регенерация, кожа, воспаление, рубец, безрубцовое заживление

Для корреспонденции: Татьяна Владимировна Шмакова. E-mail: tanesta12@gmail.com

Для цитирования: Т.В. Шмакова, Е.Ю. Кананыхина, Г.Б. Большакова. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 5-11. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-5-11.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ НИИ морфологии человека Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Номер госрегистрации ААА-А17-117013050044-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 21.05.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals

T.V. Shmakova¹, E.Yu. Kananykhina^{1,2}, G.B. Bolshakova¹

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

The review covers the main stages of the healing of skin wounds in mammals and the features of scarless healing or minimal scarring in various models (early mammalian feruses, *Acomys* mice, oral mucosa, abdominal wounds in rats).

A deeper study of the cascade of events that accompany wound healing, in particular, the factors responsible for minimizing the scarring may be helpful for better understanding the regeneration processes at both the cellular and molecular levels as a step to targeted regeneration of skin structures.

Key words: regeneration, skin, inflammation, scar, scarless healing

Corresponding author: Tatyana V. Shmakova, tanesta12@gmail.com

For citation: T.V. Shmakova, E.Yu. Kananykhina, G.B. Bolshakova. Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 5-11. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-5-11.

Funding. The research was performed within the framework of the Government contract of FSBI «Research Institute of Human Morphology», Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, State Registration No. ААА-А17-117013050044-8.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21.05.2019. Accepted 04.06.2019

Заживление ран у взрослых млекопитающих – сложный многоступенчатый процесс, в результате которого, как правило, образуется фиброзная рубцовая ткань, лишенная волос и потовых желез [1]. В настоящее время удовлетворительных способов лечения

или профилактики образования рубцов не существует, что представляет собой серьезную медицинскую и социальную проблему [2]. Тем не менее, в ряде случаев восстановление кожи сопровождается лишь незначительным фиброзированием или даже полным отсут-

ствием рубца, например у плодов в I и II триместрах беременности [3, 4]. Регенерация кожи без шрамов наблюдается у двух видов африканских иглистых мышей (*Acomys kempfi* и *Acomys percivali*) [5], у которых восстанавливаются также сальные железы, волосяные фолликулы, жировая ткань и хрящ [6]. Раны слизистой оболочки полости рта имеют тенденцию к заживлению более быстрыми темпами и, как у плода, заживают без рубцов либо с минимальным фиброзированием [7]. Экцизионная рана кожи на животе крыс отличается более быстрым закрытием (на 7-е сутки после операции площадь раны на животе составила всего $18,6 \pm 9,2\%$, на спине $77,1 \pm 10\%$ от исходного размера повреждения) и восстановлением толщины кожи по сравнению с классической моделью повреждения кожи на спине, а также значительно меньшей площадью рубца [8, 9].

Ключевую роль в репарации кожи млекопитающих, по-видимому, играет воспаление. Существуют доказательства связи между характером воспалительной реакции, обусловленным передачей сигналов между клетками воспалительного инфильтрата, и формированием фиброзной ткани [10].

Нейтрофилы – первые иммунные клетки, мигрирующие в очаг повреждения. Они наиболее многочисленны от одного до двух дней после травмы. Нейтрофилы очищают рану, фагоцитируя клеточный дебрис и бактерии [11].

В рубцовой грануляционной ткани длительно незаживающих ран наблюдали большое количество нейтрофилов, что подчеркивает их роль в стимуляции фиброобразования [12]. Напротив, у мышей с пониженным содержанием нейтрофилов закрытие раны проходило быстрее [13]. Заживление без рубцов у плода характеризуется слабой выраженностью или отсутствием воспалительной реакции вследствие незрелости иммунной системы [14]. Для иглистых мышей *Acomys* характерна нейтропения [15].

На 2-е и 3-и сутки после ранения доминирующими клетками инфильтрата становятся моноциты [16, 17], которые привлекаются в рану фрагментами белков внеклеточного матрикса (ВМ), трансформирующим ростовым фактором бета (TGF- β), моноцитарным хемотаксическим белком 1 и по прибытии превращаются в макрофаги, участвующие как в заживлении кожных ран, так и в развитии рубца [2]. Ранние раневые макрофаги служат для фагоцитоза апоптотических нейтрофилов и очищения от дебриса. Функция макрофагов – не только фагоцитоз мертвых клеток и бактерий, но и продукция различных факторов роста, таких как FGFs, PDGF, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и TGF- β , для организации ранних событий закрытия раны – реэпителизации, создания грануляционной ткани [2, 10] и последующего рубцевания [11]. Тем не менее отсутствие макрофагов не препятствует репарации. Мыши, лишённые транскрипционного фактора из семейства ETS PU.1 (и, следовательно, не способные генерировать какие-либо лейкоцитарные

линии), способны к эффективному заживлению ран по типу новорожденных животных и без последующего рубцевания, в отличие от однопометного контроля. Фагоцитоз мертвых клеток и дебриса осуществлялся близлежащими фибробластами, хотя проходил медленнее, чем у мышей дикого типа [17].

У иглистых мышей в кожной ране уровни F4/80-макрофагов и провоспалительных цитокинов низки, хотя в окружающих тканях и селезенке их количество сравнимо с таковым у мышей *M. musculus*. Таким образом, из-за отсутствия раневых макрофагов, вероятно, не происходит активации синтеза коллагенов, что способствует полноценной регенерации кожи у мышей *Acomys* [16].

Состав воспалительного инфильтрата и скорость формирования рубцовой ткани после экцизионного повреждения кожи крыс Вистар различались в зависимости от локализации раны на животе или на спине. Были установлены существенные различия в характере воспалительной реакции и формировании рубцовой ткани – более раннее уменьшение макрофагальной инфильтрации, увеличение количества активных фибробластов и начало коллагеногенеза в месте абдоминального кожного дефекта (рис. 1). На 5-е сутки после травмы доля фибробластов на животе была статистически значимо больше, чем на спине (67,8% против 53%, $p < 0,001$), а макрофагов – значимо меньше (16,9% против 28%, $p < 0,001$) [18]. На 7-е сутки после операции в ране на животе статистически значимо меньше CD-68 положительных клеток (макрофагов) и больше FAP- α -положительных фибробластов, что указывает на более ранний переход к началу коллагеногенеза [9].

Что касается тучных клеток, в ранах плода их количество было меньше и они были менее зрелыми, чем у взрослых особей [19]. Напротив, в кожной ране мышей *Acomys* было больше тучных клеток, чем у мышей *Mus musculus* [15].

Экспрессия цитокинов при регенерации кожи плодов также имеет особенности. Как известно, многофункциональные цитокиновые изоформы TGF β играют ключевую роль в заживлении ран благодаря своему воздействию на фибробласты. Сравнение ран плода и взрослых показывает, что одним из наиболее заметных и последовательных различий между ними является высокая экспрессия TGF- β 3 у плодов мыши и крысы. Концентрации TGF- β 1 и TGF- β 2 выше у взрослых, в то время как TGF- β 3 выше в ранах плодов [14]. Таким образом, развитие рубца может быть связано с относительно низкими уровнями экспрессии TGF- β 3 по отношению к TGF- β 1 и TGF β 2. Возможно, избыточная продукция TGF- β 1 способствует образованию рубцов, тогда как TGF- β 3 способствует полноценному заживлению [20]. В отличие от кожных ран раны слизистой оболочки полости рта демонстрируют значительно более низкие уровни профибротического TGF β 1 и более высокие уровни антифибротического TGF β 3 и экспрессируют меньше α -SMA при стимуляции TGF β 1 по сравнению

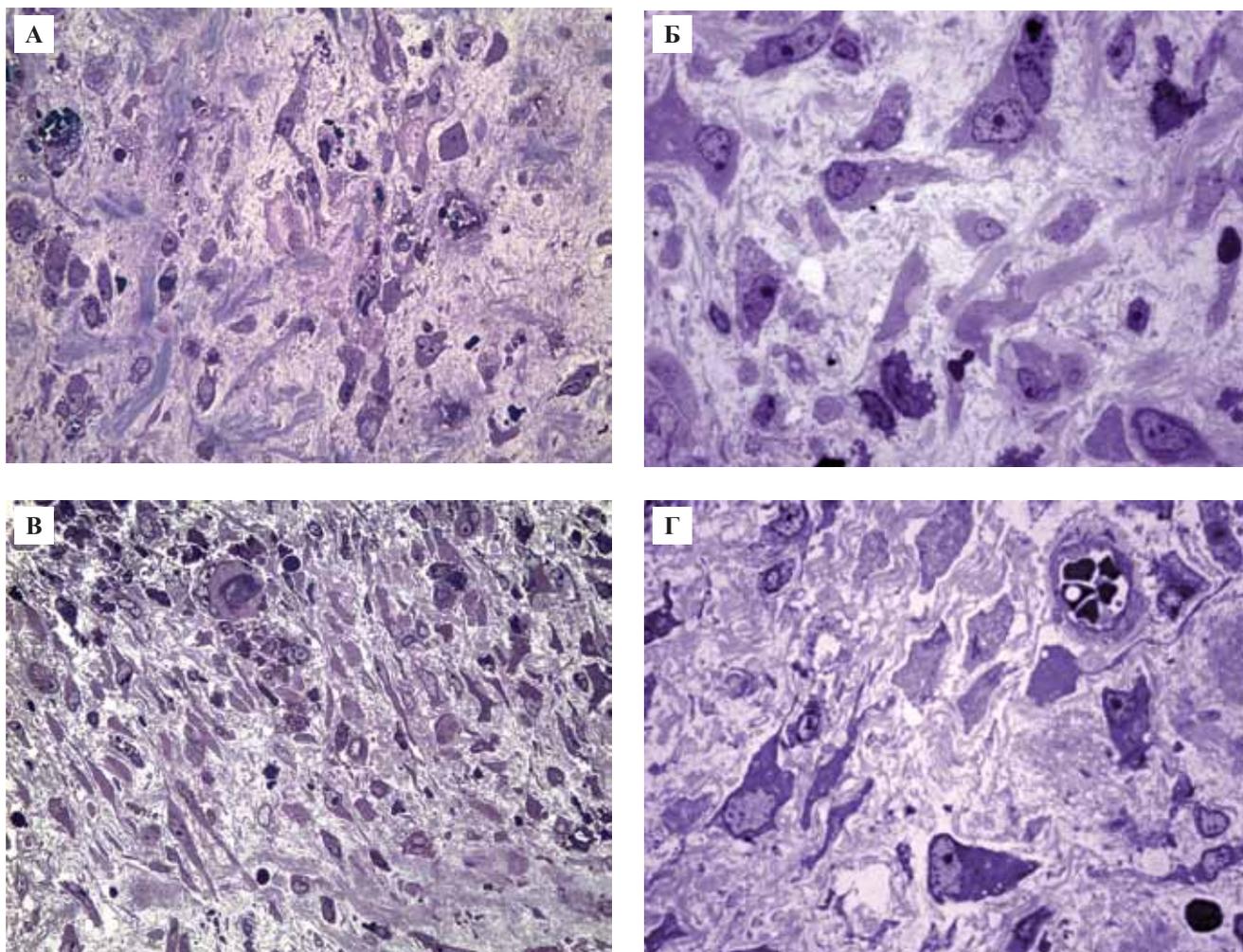


Рис. 1. Более ранний переход к началу коллагеногенеза в эксцизионной ране живота крыс через 5 суток после повреждения. Полутонкие срезы, окраска толуидиновым синим. А – рана на спине, $\times 400$, Б – рана на спине, $\times 1000$, В – рана на животе, $\times 400$, Г – рана на животе, $\times 1000$. Препараты Т.В. Шмаковой

Fig. 1. Earlier transition to collagenogenesis in an excisional wound in the abdomen of rats 5 days after injury. Semithin sections, toluidine blue stain.

А – wound on the back, $\times 400$, Б – wound on the back, $\times 1000$, В – abdominal wound, $\times 400$, Г – abdominal wound, $\times 1000$. Histological specimens by T.V. Shmakova.

с дермальными фибробластами [19]. Это указывает на более низкую чувствительность фибробластов слизистой оболочки ротовой полости к TGF β 1, что способствует безрубцовому заживлению.

Полнота регенерации кожи также может быть обусловлена составом ВМ. Так, тенасцин-С является важным регулятором пролиферации и миграции клеток во время заживления ран, и его базальный уровень экспрессии заметно выше в слизистой оболочке нёба, чем в коже взрослых млекопитающих. Ранение слизистой оболочки полости рта млекопитающего приводит к длительной экспрессии тенасцина-С, аналогичной ранам плода [2, 14]. Следовательно, повышенная и продолжительная экспрессия тенасцина-С может играть роль в ускоренном заживлении ран.

Другой молекулой ВМ, которая играет роль в заживлении ран, является гиалуроновая кислота (ГК), синтез

которой зависит от активности различных изоформ гиалуронансинтазы (ГАС). В отличие от дермальных фибробластов фибробласты слизистой оболочки ротовой полости человека демонстрируют дифференциальную экспрессию подтипов ГАС и продукцию ГК [21]. Хотя оба подтипа фибробластов экспрессируют изоформы ГАС-2, воздействие TGF β 1 усиливает экспрессию ГАС-2 в дермальных фибробластах, в то время как в фибробластах полости рта человека экспрессия понижается [22].

Количество ГК, способствующей клеточной адгезии, пролиферации и миграции, выше в ране плода, чем у взрослой особи [2, 4].

Ключевое событие образования рубца – синтез коллагена. Мигрирующие фибробласты секретируют внеклеточный матрикс, состоящий из гликозаминогликанов, протеогликанов и коллагена. Фиброгенез

является жестко регулируемым процессом, определяемым последовательностью молекулярных сигналов и механизмами клеточного ответа. Локальная активация фибробластов и других коллагенпродуцирующих мезенхимальных клеток происходит в ответ на высвобождение биологически высокоактивных растворимых медиаторов (алармины, цитокины, хемокины) [23]. Реакция фибробластов во время заживления ран определяет результат восстановления тканей. Популяции клеток, способствующих образованию фибриллярных коллагенов и неструктурных белков-регуляторов в ВМ, состоят из резидентных фибробластов и их предшественников, мезотелиальных клеток, циркулирующих фиброцитов, эпителиальных клеток, эндотелиальных клеток, перicyтов [24], гладкомышечных клеток сосудов и других специализированных типов клеток [23].

Фибробласты в ране трансформируются в миофибробласты, чувствительные к химическим сигналам (цитокины, хемокины и факторы роста), что способствует усиленному производству ВМ [25]. Присутствие гладкомышечного актина позволяет миофибробластам вызывать сближение краев раны и уменьшать площадь раневой поверхности [2]. Перемещаясь по раневой среде, фибробласты и другие клетки синтезируют матричные металлопротеиназы (ММП), очищая путь от фрагментов матрикса и клеток. При нормальном заживлении ран большинство фибробластов претерпевает апоптоз после синтеза адекватного количества ВМ. Хотя синтез коллагена и ВМ необходим для эффективного закрытия раны, его результатом может быть развитие фиброза и образование кожных рубцов [2].

Фибробласты плодов отличаются способностью синтезировать и разрушать ВМ и обладают более высокой пролиферативной и миграционной активностью, которая уменьшается с возрастом. Заживление ран у взрослых связано с начальной пролиферацией фибробластов с последующим синтезом ВМ, а в ране плода ее фибробласты пролиферируют и депонируют ВМ одновременно [14]. Важно то, что в ране плода миофибробласты отсутствуют. Тем не менее фибробласты кожи плода и полости рта обладают способностью к сокращению, несмотря на отсутствие экспрессии α -SMA. Низкая сократительная активность фибробластов полости рта может быть одним из факторов, способствующих ускоренному заживлению дефектов этой области и слабо выраженному образованию рубцов.

Во время безрубцового заживления доля ММП выше, чем активность ингибиторов, в частности тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП). Это соотношение фермент-ингибитор способствует ремоделированию ВМ с меньшим содержанием коллагена [26]. В ранах слизистой оболочки полости рта отношение ММП к ТИМП также повышено и сопоставимо с таковым в фетальных ранах [27].

Термин «дермальные фибробласты» является упрощением динамической, гетерогенной популяции клеток, которые демонстрируют различия с точки зрения

эмбриологического происхождения, анатомического распределения и функциональных профилей в норме и патологии. Гетерогенность фибробластов играет решающую роль в заживлении ран без рубцов и полном восстановлении структуры нативной ткани у плода и слизистой оболочки рта, а также чрезмерном образовании коллагена в болезненных состояниях, таких как келоиды и гипертрофические рубцы [28].

Немаловажно то, что, несмотря на свой общий фенотип, фибробласты не являются однородной популяцией. Исследования в области молекулярной биологии доказали природу гетерогенности фибробластов, показывая, что субпопуляции дермальных фибробластов демонстрируют различные паттерны экспрессии генов и варибельные функции [29].

Фибробласты в разных частях тела имеют различное эмбриональное происхождение: фибробласты кожи лица образуются из нервного гребня, дорсальной кожи – из дерматомиотома, а вентральной кожи – из мезодермы боковой пластинки [30, 31]. Продемонстрировано сохранение двух разных признаков эмбриональных фибробластов: Wnt1-положительных и Wnt1-отрицательных (Wnt1⁺/Wnt1⁻) фибробластов в слизистой оболочке полости рта и En1⁺/En1⁻ фибробластов в дорсальной коже взрослых мышей. Линии фибробластов Wnt1⁺ и En1⁺ вносят вклад в основную массу [32].

Driskell et al. (2013) определили, что дермальные фибробласты спины также неоднородны: они возникают из мультипотентной популяции предшественников, которая экспрессирует PDGFR α , Dlk1 и Lrig1 и при дифференцировке дает начало всем дермальным линиям фибробластов. На ранних этапах развития субпопуляции, экспрессирующие PDGFR α , Lrig1 и Blimp1, вызывают образование фибробластов папиллярной дермы, в то время как субпопуляция, экспрессирующая PDGFR α , Dlk1 и Scf1, приводит к образованию ретикулярных и подкожных фибробластных линий. Фибробласты верхней дермы регулируют рост волос, образование волосяных фолликулов и мышцы *arrector pili*, синтезируя большую часть фибриллярного ECM и преадипоцитов. Адипоциты гиподермы способствуют регенерации кожи [33].

Таким образом, фибробласты кожи существуют в виде морфологически и функционально гетерогенных субпопуляций: популяция фибробластов в поверхностных слоях дермы (папиллярная дерма) физиологически отличается от популяции в более глубоких слоях (ретикулярная дерма).

Папиллярная дерма состоит из тонких, плохо организованных пучков коллагеновых волокон, в то время как толстые, хорошо организованные пучки коллагена характеризуют ретикулярную дерму [34]. Папиллярная дерма также имеет более высокое отношение коллагена типа III к коллагену типа I, более высокие уровни декорина и более низкие уровни хондроитинового протеогликана по сравнению с ретикулярной

дермой [35]. Папиллярные дермальные фибробласты экспрессируют более высокие уровни интерлейкина-6 (IL-6) *in vitro* как конститутивно, так и при воздействии интерлейкина-1 α . Культивируемые фибробласты из более глубоких слоев дермы экспрессируют больше TGF β , фактора роста соединительной ткани, α -SMA, белка теплового шока 47, коллагена типа I и версикана по сравнению с поверхностными дермальными фибробластами, что указывает на их предрасположенность к образованию гипертрофических рубцов [36]. Такие различия в составе и организации ВМ играют роль в контроле поведения фибробластов и их реакции на заживление ран и образование рубцов.

Существует также популяция фибробластов, связанная с волосяными фолликулами (фолликулярными дермальными сосочками и фибробластами корневого влагища) [34, 37].

В свою очередь, в промежуточных зонах дермы было показано существование дополнительных подтипов фибробластов [38], но эти популяции остаются не полностью охарактеризованными, и, следовательно, истинные масштабы гетерогенности дермальных фибробластов до конца не изучены. Известно, что популяции фибробластов данного участка могут отличаться по морфологии, репликативному потенциалу и биохимической активности, в частности продукции коллагена, что важно для поддержания гомеостатических уровней интерстициального коллагена типов I, III и V, а также при патологических состояниях [39]. Выявлены также быстро пролиферирующие клетки, которые меньше по размеру и не экспрессируют α -SMA, и вторая популяция более крупных, медленно пролиферирующих клеток [34].

Популяция фибробластов слизистой оболочки полости рта взрослых людей имеет больше общего с фибробластами плода, чем с их кожными аналогами: они активнее пролиферируют, быстрее заселяют раны и являются «репликативно моложе», чем дермальные фибробласты [40].

Отношение количества коллагена типа III к коллагену типа I в новообразованной фиброзной ткани выше, чем в незаживающих ранах или зрелом рубце [6]. Последующее ремоделирование коллагена, а также сдвиг в сторону более нормального соотношения коллагена типа I к коллагену типа III приводит к зрелому рубцу. Реорганизация внеклеточного матрикса с помощью ММП и коллагеназ сопровождается снижением клеточности и сосудистости рубцовой ткани. В ране плода отношение коллагена типа III к коллагену типа I выше, чем у взрослого [14]. Фибробласты плодов мышей и крыс синтезируют большее количество общего коллагена и более высокую долю коллагена типа III по сравнению с коллагеном типа I, чем фибробласты дермы у взрослых особей [41].

В рубце на животе крыс, напротив, соотношение более зрелого коллагена типа I к коллагену типа III на 20-е и 30-е сутки после операции было значимо

больше, чем на спине, что, вероятно, обуславливает его более высокую прочность на разрыв на 30-е сутки после вмешательства. На этом сроке абдоминальный рубец содержит эластин, объемная доля которого не отличается от таковой в интактной коже живота и спины, в то время как в рубце на спине эластин отсутствовал [9].

Более глубокое изучение каскада событий, которые сопровождают заживление ран, в частности факторов, обуславливающих минимизацию кожного рубца или его отсутствие, на разных моделях заживления ран помогут лучше понять процессы регенерации как на клеточном, так и на молекулярном уровне, что может быть использовано для разработки методов восстановления утраченных кожных структур.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – Г.Б.Б.
Сбор и обработка материала – Т.В.Ш., Е.Ю.К.
Написание текста – Т.В.Ш., Е.Ю.К.
Редактирование – Г.Б.Б.

Литература/References

1. *Walmsley GG, Maan ZN, Wong VW, Duscher D, Hu MS, Zielins ER et al.* Scarless wound healing: chasing the holy grail. Plastic and reconstructive surgery. 2015;135(3):907–17. doi:10.1097/PRS.0000000000000972.
2. *Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, Barnes LA et al.* Cutaneous scarring: basic science, current treatments, and future directions. Advances in wound care. 2018;7(2):29–45. doi:10.1089/wound.2016.0696.
3. *Lo DD, Zimmermann AS, Nauta A, Longaker MT, Lorenz HP.* Scarless fetal skin wound healing update. Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews. 2012; 96:237–47. doi: 10.1002/bdrc.21018
4. *Lorenz HP, Longaker MT, Perkocha LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS.* Scarless wound repair: a human fetal skin model. Development. 1992; 114:253–59.
5. *Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR et al.* Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). Nature. 2012; 489:561–5. doi:10.1038/nature11499.
6. *Gawriluk TR, Simkin J, Thompson KL, Biswas SK, Clare-Salzler Z, Kimani JM et al.* Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. Nature communications. 2016;7:11164. doi:10.1038/ncomms11164.
7. *Szpaderska A.M., Walsh C.G., Steinberg M.J, DiPietro L.A.* Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. Journal of dental research. 2005;84(4):309–14. Available from: doi:10.1177/154405910508400403/
8. *Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б.* Количественная характеристика полноты регенерации кожи при заживлении раны на спине и животе крыс. Клиническая и экспериментальная морфология. 2016;1:27–36 [Kananykhina EYu, Bol'shakova GB. Quantitative characteristics of the extent of regeneration in the healing of dorsal and ventral rat skin wounds. Clin. Exp. Morphology. 2016;1:27–36 (In Russ.)].

9. Кананыхина Е.Ю., Русанов Ф.С., Большакова Г.Б. Морфофункциональные особенности формирования рубцовой ткани при заживлении ран различной локализации у крыс. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017; 4:44–51 [Kananykhina EYu, Rusanov FS, Bol'shakova GB. Morphofunctional features in the formation of scar tissue in the healing of wounds of various locations in rats. Clin. Exp. Morphology. 2017;4:44–51 (In Russ.)].
10. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015; 5(1): a023267. doi:10.1101/cshperspect.a023267.
11. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Dermatologic surgery. 2005;31:674–86.
12. Qian LW, Fourcaudot AB, Yamane K, You T, Chan RK, Leung KP. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. Wound repair and regeneration. 2016; 24: 26–34. doi:10.1111/wrr.12381
13. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. Journal of leukocyte biology. 2003; 73:448–455. doi:10.1189/jlb.0802406.
14. Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. Plastic and reconstructive surgery. 2010;126:1172–1180. Available from: doi:10.1097/PRS.0b013e3181eae781.
15. Brant JO, Yoon JH, Polvadore T, Barbazuk WB, Maden M. Cellular events during scar-free skin regeneration in the spiny mouse, *Acomys*. Wound repair and regeneration. 2016;24(1):75–88. doi:10.1111/wrr.12385.
16. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature. 2008;453:314–321. doi:10.1038/nature07039.
17. Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R et al. Wound healing in the PU.1 null mouse — Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. Current biology. 2003;13: 1122–8.
18. Шмакова Т.В. Морфологические особенности начала коллагеногенеза в кожных ранах различной локализации у крыс: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». М.: 2018. С. 78–79 [Shmakova T.V. Morphological features of the collagenogenesis onset in skin wounds of various locations in rats: Materials of the All-Russian scientific conference with international participation 'Actual issues of morphogenesis in health and pathology'. Materialy Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem 'Aktual'nyye voprosy morfogeneza v norme i patologii'. Moscow: 2018. S. 78–79 (In Russ.)].
19. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H et al. Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. The journal of histochemistry and cytochemistry. 2009;57:543–557. doi:10.1369/jhc.2009.952572.
20. Le M, Naridze R, Morrison J, Biggs LC, Rhea L, Schutte BC et al. Transforming growth factor beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. PLoS ONE. 2012;7(10):e48040. doi:10.1371/journal.pone.0048040
21. Yamada Y, Itano N, Hata K, Ueda M, Kimata K. Differential regulation by IL-1beta and EGF of expression of three different hyaluronan synthases in oral mucosal epithelial cells and fibroblasts and dermal fibroblasts: quantitative analysis using real-time RT-PCR. The Journal of investigative dermatology. 2004;122:631–9. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22332.x.
22. Meran S, Thomas D, Stephens P, Martin J, Bowen T, Phillips A et al. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. The Journal of biological chemistry. 2007 282:25687–97. doi:10.1074/jbc.M700773200.
23. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. Molecular aspects of medicine. 2019;65:2–15. doi:10.1016/j.mam.2018.06.003.
24. Di Carlo SE, Peduto L. The perivascular origin of pathological fibroblasts. The Journal of clinical investigation. 2018;128: 54–63. doi:10.1172/JCI93558.
25. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. Frontiers in pharmacology. 2014;5:123. doi:10.3389/fphar.2014.00123.
26. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. Cellular and molecular life sciences. 2013;70:2059–81. doi:10.1007/s00018-012-1152-9.
27. Dang CM, Beanes SR, Lee H, Zhang X, Soo C, Ting K. Scarless fetal wounds are associated with an increased matrix metalloproteinase-to-tissue-derived inhibitor of metalloproteinase ratio. Plastic and reconstructive surgery. 2003;111:2273–85. doi:10.1097/01.PRS.0000060102.57809.DA.
28. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. European journal of cell biology. 2015;94(11):483–512. doi:10.1016/j.ejcb.2015.08.001.
29. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. PLoS genetics. 2006;2(7): e119. doi:10.1371/journal.pgen.0020119.
30. Houzelstein D, Cheraud Y, Auda-Boucher G, Fontaine-Perus J, Robert B. The expression of the homeobox gene *Msx1* reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. Development. 2000;127:2155–64.
31. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann M.T, Rochat A, Pietri T, Suter U et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. The Journal of cell biology. 2006;175:1005–1015. doi: 10.1083/jcb.200606062.
32. Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. Science. 2015; 348(6232):aaa2151. doi:10.1126/science.aaa2151.
33. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. Nature. 2013;504(7479):277–81. doi:10.1038/nature12783.
34. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with

- keratinocytes. *Journal of cellular physiology*. 2004;200(1): 134–145. doi: 10.1002/jcp.10474.
35. Schönherr E., Beavan L.A., Hausser H., Kresse H, Culp L.A. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro. *The Biochemical journal*. 1993; 290(3):893–9. doi:10.1042/bj2900893.
 36. Varkey M, Ding J, Tredget EE. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar. *Biomaterials*. 2011;32:7581–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.070.
 37. Honardoust D, Ding J, Varkey M, Shankowsky HA, Tredget EE. Deep dermal fibroblasts refractory to migration and decorin-induced apoptosis contribute to hypertrophic scarring. *Journal of burn care and research* 2012;33:668–77. doi:10.1097/BCR.0b013e31824088e3.
 38. Akagi A, Tajima S, Ishibashi A, Yamaguchi N, Nagai Y. Expression of type XVI collagen in human skin fibroblasts: enhanced expression in fibrotic skin diseases. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113:246–50. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00663.x.
 39. Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Dittmann K, Albiez M.. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Experimental cell research*. 1989;180:84–93.
 40. Enoch S, Peake MA, Wall I, Davies L, Farrier J, Giles P et al. ‘Young’ oral fibroblasts are geno/phenotypically distinct. *Journal of dental research* 2010;89:1407–13. doi:10.1177/0022034510377796.
 41. Carter R, Jain K, Sykes V, Lanning D. Differential expression of procollagen genes between mid- and late-gestational fetal fibroblasts. *The Journal of surgical research*. 2009;156:90–4. doi:10.1016/j.jss.2009.03.056.

Информация об авторах/Author information

Татьяна Владимировна Шмакова – младший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.
Tatyana V. Shmakova – Junior Researcher, Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-5722-5417>

Евгения Юрьевна Кананыхина – младший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека; младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦ АГиП им. акад. В.И. Кулакова.
Evgeniya Yu. Kananykhina – Junior Researcher, Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology. Junior Researcher, Laboratory Regenerative Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0002-9779-2918>

Галина Борисовна Большакова – доктор биологических наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека.
Galina B. Bol'shakova – Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-9669-0821>

Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов

А.А. Грядунова^{1,2}, Е.А. Буланова¹, Е.В. Кудан¹, Ф.Д.А.С. Перейра¹, Ю.Д. Хесуани¹, В.А. Миронов^{1,2}

¹ ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия

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

Обзор посвящен масштабируемой биофабрикации тканевых сфероидов единого размера и формы и оценке их морфологических и биологических свойств. Проведен сравнительный анализ существующих методов, позволяющий выбрать оптимальный протокол получения и характеристики тканевых сфероидов.

Ключевые слова: тканевые сфероиды, биофабрикация, биопечать, поиск новых лекарственных средств, морфологическая оценка

Для корреспонденции: Анна Александровна Грядунова. E-mail: agryadunova@bioprinting.ru.

Для цитирования: А.А. Грядунова, Е.А. Буланова, Е.В. Кудан, Ф.Д.А.С. Перейра, Ю.Д. Хесуани, В.А. Миронов. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 12-20. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-12-20.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 01.04.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

Scalable biofabrication and morphology evaluation of tissue spheroids

А.А. Gryadunova^{1,2}, Е.А. Bulanova¹, Е.В. Koudan¹, F.D.A.S. Pereira¹, Yu.D. Khesuani¹, V.A. Mironov^{1,2}

¹ Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions» Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

The review focuses on techniques for scalable standardized tissue spheroids biofabrication, on tissue spheroids biological properties and the methods for its morphology evaluation. The comparative analysis of existing approaches provided here will guide to the optimal protocol for tissue spheroids fabrication and characterization.

Key words: tissue spheroids, biofabrication, bioprinting, drug discovery, morphology evaluation

Corresponding author: Anna A. Gryadunova. E-mail: agryadunova@bioprinting.ru.

For citation: A.A. Gryadunova, E.A. Bulanova, E.V. Koudan, F.D.A.S. Pereira, Yu.D. Khesuani, V.A. Mironov. Scalable biofabrication and morphology evaluation of tissue spheroids. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 12-20. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-12-20.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 01.04.2019. Accepted 04.06.2019

1. Методы биофабрикации тканевых сфероидов

Тканевые сфероиды представляют собой трехмерные плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы [1]. Плотная упаковка клеток, трехмерная структура и способность к слиянию при непосредственном контакте друг с другом позволяют использовать сфероиды в качестве строительных блоков для биопечати конструкторов человеческих органов и тканей [2]. Благодаря этому сфероиды находят применение в тканевой инженерии при изготовлении функциональных тканей и конструкторов органов, пригодных для трансплантации [3]. В настоящее время такие тка-

неинженерные структуры все чаще используют для тестирования новых лекарственных средств как более адекватную и информативную модель в сравнении с классической двумерной. Следовательно, необходимы эффективные методы биофабрикации, позволяющие одновременно получать большое количество тканевых сфероидов единого размера и формы.

Формирование тканевых сфероидов происходит путем самосборки различных типов клеток в трехмерные шарообразные структуры. Тканевые сфероиды могут быть получены из клеточной суспензии, содержащей первичные или иммортализованные клетки [4]. Возможно также использование линий раковых клеток или

опухолевых клеток, выделенных непосредственно из организма пациента, или биофабрикация тканевых сфероидов из стволовых клеток с их последующей дифференцировкой [5, 6]. Иной принцип формирования тканевых сфероидов предполагает выделение небольших фрагментов эмбриональной ткани с последующим их округлением [7]. Данный метод является технически более сложным, так как требует осторожного обращения с эмбриональной тканью, которая крайне чувствительна к факторам внешней среды (рис. 1). В некоторых случаях может также использоваться ткань взрослых организмов [8].

Широко используемыми методами биофабрикации тканевых сфероидов являются а) культивирование во вращающейся колбе [9], б) культивирование с постоянным перемешиванием [10], в) метод висячей капли [11], г) использование агарозных форм [12], д) использование низкоадгезивных коммерческих многолуночных планшетов [13, 14], е) фабрикация сфероидов с применением акустических или магнитных полей [15, 16] и т.д. Несмотря на многообразие существующих методов, в настоящее время только некоторые из них позволяют формировать тканевые сфероиды в большом количестве, необходимом и достаточном для использования в биопечати и скрининге при разработке новых лекарственных средств. Большое количество тканевых сфероидов необходимо для полноценного и всестороннего анализа их морфологического статуса. Значительное число сфероидов также позволяет производить тканевые и органные конструкторы крупных размеров. Еще одним чрезвычайно важным требованием при использовании тканевых сфероидов в указанных областях является стандартизация, то есть возможность биофабрикации сфероидов единого размера и формы. Это особенно важно при роботизированном получении трехмерных конструкторов согласно цифровой модели. К масштабируемым методам биофабрикации сфероидов единого размера и формы относятся а) метод висячей капли, б) использование агарозных форм в) получение сфероидов в низкоадгезивных коммерческих многолуночных планшетах (табл. 1).

Классический метод висячей капли предполагает равномерное распределение суспензии клеток в подвешенных каплях питательной среды, где клетки образуют плотные трехмерные структуры под действием силы тяжести [17, 18]. В висячих каплях сложно и трудозатратно производить смену питательной среды и добавлять тестируемые соединения к тканевым сфероидам, поэтому данный метод не подходит для долговременного культивирования и тестирования лекарственных средств. Более того, часто наблюдается образование так называемых сателлитов – округлых агрегатов небольшого размера, располагающихся рядом с основным тканевым сфероидом. Тем не менее современные планшеты позволяют автоматизировать метод и значительно упрощают последующий анализ тканевых сфероидов [19].

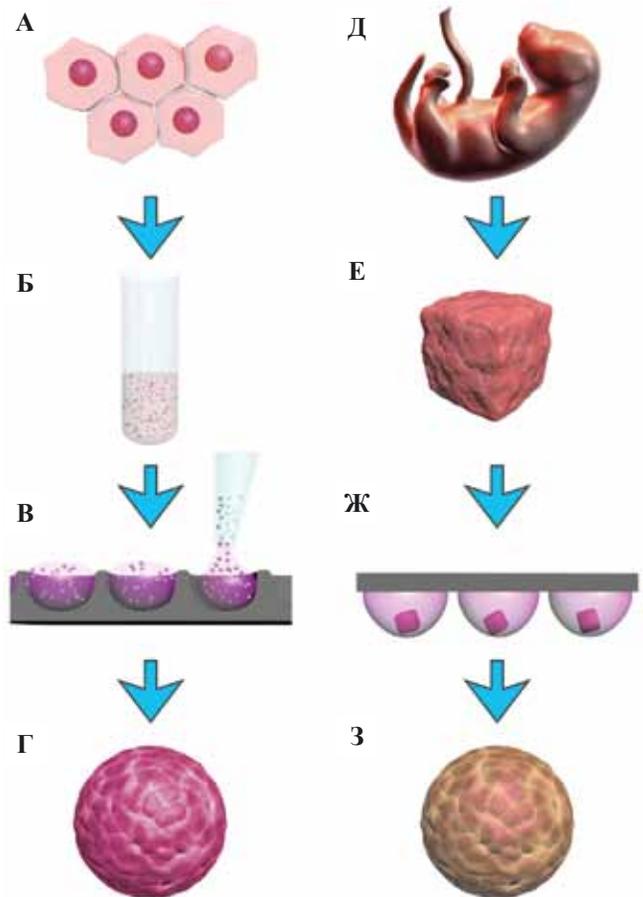


Рис. 1. Методы получения тканевых сфероидов:

1. из клеточной суспензии: А – клетки культивируют до достижения 90% конфлюентности; Б – после снятия с культуральной фляжки клетки суспендируют в питательной среде; В – клеточную суспензию помещают в ячейки низкоадгезивного планшета; Г – через 24 часа происходит формирование тканевого сфероида.
2. из выделенных фрагментов тканей: Д – источником получения сфероидов служит эмбрион животного; Е – из эмбриона выделяют желаемую ткань; Ж – полученные эмбриональные экспланты помещают в висячие капли в питательной среде; З – через 24 часа округлившись эксплант формирует тканевый сфероид

Fig. 1. Methods for tissue spheroids production:

1. single cell suspension: А – cells are cultured until 90% confluency; Б – after detaching from the flask surface cells are resuspended in cell culture medium; В – cell suspension is dispensed to the wells of low-adhesive microplate; Г – after 24 hours, tissue spheroid is formed.
2. tissue fragments: Д – the source of tissue spheroids is the animal embryo; Е – the tissue is isolated from the embryo; Ж – embryonic explants are placed in the hanging drop culture o/n for rounding; З – the resulted tissue spheroid is formed after 24 hours

Сравнительный анализ масштабируемых методов биофабрикации тканевых сфероидов единого размера и формы
The comparative analysis of the scalable methods for biofabrication of tissue spheroids of the same size and shape

Метод	Преимущества	Недостатки	Ссылки
Висячая капля	Невысокая стоимость Простота извлечения и переноса сфероидов Возможность автоматизации последующего анализа	Высокие трудовые и временные затраты Сложность в смене среды и добавления тестируемых соединений Образование сателлитов	[1], [9], [10], [14], [24]
Низкоадгезивные планшеты	Однородный диаметр стероидов Простая процедура смены среды Простота анализа сфероидов Возможность автоматизации	Высокая стоимость Однократное использование	[11], [12], [17], [25]
Агарозные формы	Невысокая стоимость Доступность сырья Возможность одновременного получения большого количества сфероидов Многokrатное использование силиконовых штампов	Менее однородные диаметр сфероидов Сложность в извлечении сфероидов Неудобство последующего анализа Образование сателлитов	[3], [7], [16], [17], [21]

При применении низкоадгезивных планшетов клетки опускаются на дно ячейки под воздействием силы тяжести. Низкоадгезивная поверхность и округлая форма ячейки препятствуют взаимодействию клеток с субстратом и расплыванию на дне, что способствует установлению межклеточных контактов и слиянию клеток между собой с образованием сфероида, размер которого зависит от начальной концентрации клеток в суспензии. Низкоадгезивные планшеты позволяют получать сфероиды единого размера и формы в значительных количествах, данный метод может быть автоматизирован и позволяет легко производить смену питательной среды и добавление тестируемых соединений. К недостаткам метода можно отнести высокую стоимость и невозможность многократного использования коммерческих низкоадгезивных планшетов.

Формирование тканевых сфероидов в агарозных формах также основано на неадгезивности материала. Горячий раствор агарозы заливается в силиконовый штамп, охлаждается и застывает. Извлеченный обратный слепок с ячейками из агарозы – агарозная форма – заполняется клеточной суспензией, клетки опускаются на дно формы под воздействием силы тяжести, устанавливаются межклеточные контакты и формируют тканевые сфероиды в течение 24 часов [20]. Применение агарозных форм делает возможным получение большого количества сфероидов, при этом силиконовый штамп можно использовать многократно. И тем не менее по сравнению с низкоадгезивными планшетами данный метод проигрывает в однородности диаметров образующихся сфероидов. Использование агарозных форм в некоторых случаях не исключает образование сателлитов.

При использовании тканевых сфероидов в области трехмерной биопечати перед исследователями

встает вопрос, какой метод предпочтительнее использовать для решения конкретных задач исследования. Метод висячей капли хорошо подойдет в тех случаях, когда необходимо приготовить небольшое количество сфероидов с заданным диаметром. Если нужно получить большое количество сфероидов с минимальными трудовыми и денежными затратами, рекомендуется использование агарозных форм. В тех же случаях, когда требуется достижение максимального единообразия диаметров, для получения сфероидов рекомендуется использовать низкоадгезивные планшеты. Они также хорошо зарекомендовали себя при тестировании новых лекарственных препаратов, так как позволяют наблюдать за изменениями, происходящими с каждым отдельным сфероидом, что является критичным требованием для построения концентрационных кривых.

2. Методы визуализации и морфологической оценки тканевых сфероидов

Морфологическая оценка тканевых сфероидов с применением комплекса современных методов анализа позволяет подтвердить нормальное функционирование клеток внутри сфероида, вовремя отследить неподходящие условия культивирования и модифицировать их. Существующие методы можно условно разделить на две группы: высокопроизводительные методы с быстрой обработкой большого объема данных (англ. high-throughput) и низкопроизводительные точные методы глубокого анализа (англ. high-content). К первой группе методов можно отнести фазово-контрастную микроскопию и количественную оценку жизнеспособности клеток в сфероидах. Ко второй группе относятся конфокальная и двухфотонная микроскопия, сканирующая и трансмиссионная

электронная микроскопия, гистохимические и иммуногистохимические исследования.

2.1. Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия вследствие своей простоты и доступности является наиболее широко используемым методом оценки состояния тканевых сфероидов (рис. 2 А). Она не требует дорогостоящего оборудования, дополнительных реактивов и проводится с использованием обычного оптического инвертированного микроскопа (например, Nikon Eclipse Ti-S, Olympus IX73 и т.д.). Основное преимущество метода – возможность прижизненного неинвазивного неструктурного наблюдения за одним и тем же тканевым сфероидом в течение всего времени культивирования без риска контаминации. Тем не менее, поскольку тканевые сфероиды являются трехмерными структурами, оценить состояние клеток во всем объеме сфероида с использованием данного метода довольно затруднительно.

2.2. Оценка жизнеспособности клеток в сфероидах

Оценка жизнеспособности клеток в тканевом сфероиде может производиться качественными и количественными методами. Традиционно количественную оценку проводят с помощью МТТ-теста, по определению активности лактатдегидрогеназы либо с использованием индикатора аламарового синего. Более современными являются реактивы, выявляющие количество живых (CellTiter-Glo®) или мертвых (CellTox™ Green) клеток в сфероиде, которое оценивают по интенсивности либо люминесцентного, либо флуоресцентного сигнала, считываемого с использованием планшетного анализатора (например, VictorX3 PerkinElmer и подобных).

Для качественной оценки жизнеспособности рекомендуется метод Live/Dead, который используется для одновременной флуоресцентной окраски живых и мертвых клеток (рис. 2 Б). Реактивы ацетоксиметилловый эфир кальцеина (англ. calceinacetoxymethyl,

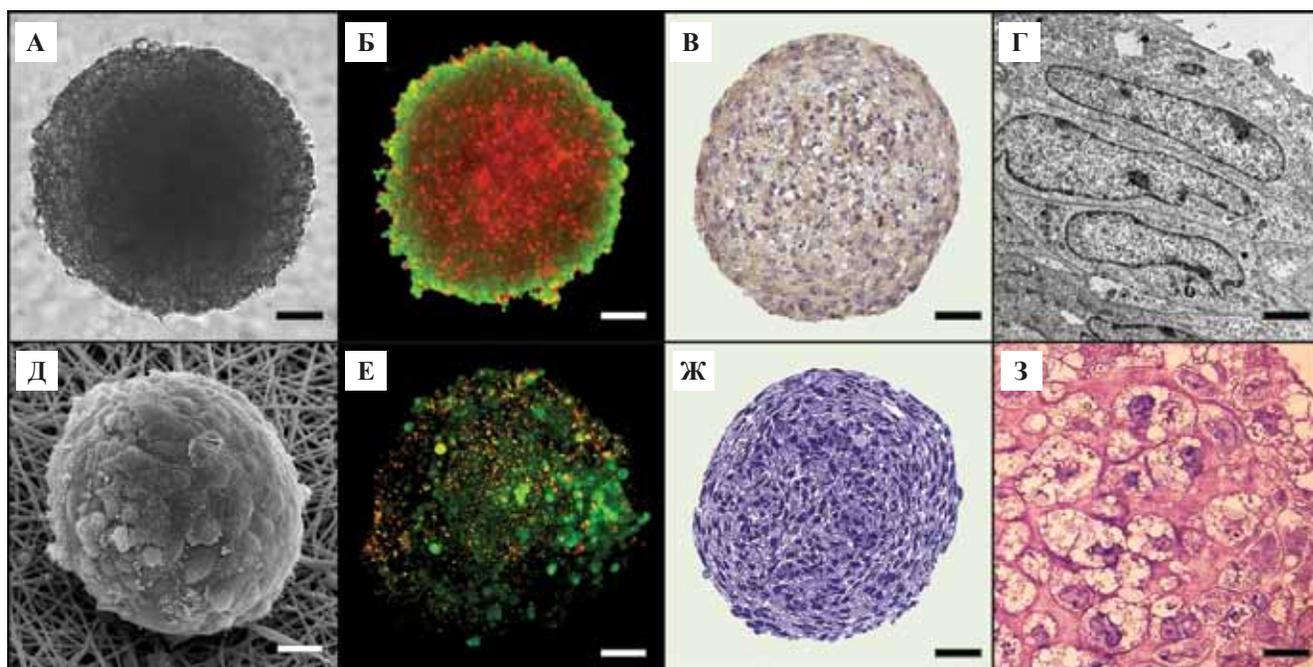


Рис. 2. Морфологическую оценку и визуализацию тканевых сфероидов проводят несколькими методами.

А – фазово-контрастная микроскопия; Б – анализ жизнеспособности клеток методом Live/Dead, сфероид из клеток HepG2, 10000 клеток/сфероид, культивирование в течение 3 дней [33]; В – иммуногистохимическое исследование, окраска на агрекан; Г – трансмиссионная электронная микроскопия; Д – сканирующая электронная микроскопия; Е – двухфотонная микроскопия, сфероид из клеток HCT116, 100 клеток/сфероид, культивирование в течение 7 дней [34]; Ж – оценка полутонких срезов; З – гистологическое исследование.

А, В, Г, Д, Ж, З – сфероид из первичных хондроцитов барана, 8000 клеток/сфероид, культивирование в течение 7 дней [29]. Размерная шкала: А–В, Д–Ж – 50 мкм; Г – 20 мкм; З – 5 мкм

Fig. 2. Different methods are used for morphology evaluation and visualization of tissue spheroids: А – phase-contrast microscopy; Б – Live/Dead cell viability assay, HepG2 spheroid, 10000 cells/spheroid, 3 days in culture [33]; В – immunohistochemical analysis, aggrecan is highlighted brown; Г – transmission electron microscopy; Д – scanning electron microscopy; Е – two-photon microscopy, spheroid from HCT116 cells, 100 cells/spheroid, 7 days in culture [34]; Ж – evaluation of semi-thin sections; З – histological examination А, В, Г, Д, Ж, З – spheroid from primary sheep chondrocytes, 8000 cells/spheroid, 7 days in culture [29]. Scalebars: А, Б, В, Д, Е, Ж – 50 μ m; Г – 20 μ m; З – 5 μ m

Calcein-AM) и йодид пропидия (англ. propidium iodide, PI) окрашивают живые и мертвые клетки, соответственно. В качестве красителя мертвых клеток также может использоваться бромистый этидий (англ. ethidiumbromidehomodimer, EthD-1).

2.3. Иммуногистохимическое исследование

Данный метод позволяет следить за изменениями морфологии и состава тканевых сфероидов при помощи окраски определенных компонентов клеток с использованием специфических антител. Содержание интересующих компонентов можно изучать по изменению интенсивности окраски гистологических срезов на заданных этапах культивирования (рис. 2 В). Будучи широко распространенным и относительно недорогим, указанный метод тем не менее требует привлечения высококвалифицированного персонала и сложен для проведения количественного анализа.

2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия позволяет определить состояние клеток, находящихся в тканевом сфероиде – не только на поверхности, но и в толще сфероида – при анализе его ультратонких срезов (рис. 2 Г). Метод подходит для прослеживания изменений в клетках, включая, например, признаки клеточной дегенерации, индуцированной гипоксией, позволяющие предположить неподходящие условия культивирования. Одновременно с этим трансмиссионная электронная микроскопия является чрезвычайно трудоемким и дорогостоящим методом.

2.5. Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия часто используется для оценки статуса и морфологии клеток на поверхности сфероида, а также для оценки распластывания последнего на адгезивной поверхности (рис. 2 Д). Основным достоинством метода является высокая разрешающая способность. К недостаткам можно отнести относительно высокую стоимость и специфическую пробоподготовку. Кроме того, сканирующая электронная микроскопия без дополнительной обработки образцов дает информацию только о структурных свойствах поверхности без оценки внутреннего строения сфероида [21, 22].

2.6. Двухфотонная и конфокальная микроскопия

Преимуществами данной группы методов являются высокая разрешающая способность, возможность наблюдения клеток внутри сфероида и получение серийных оптических срезов, позволяющих при помощи программного обеспечения произвести трехмерную реконструкцию исследуемого тканевого сфероида и получить его трехмерное изображение без использования трудоемкой методики по изготовлению и фотографированию серийных гистологических срезов (рис. 2 Е). Основной недостаток – высокая стоимость оборудова-

ния. Метод требует привлечения специально обученного специалиста.

2.7. Оценка полутонких срезов, гистохимические исследования

Полутонкие срезы позволяют дать представление о строении клеток внутри всего объема сфероида с визуализацией ядер, цитоплазмы, внеклеточного матрикса и других компонентов в зависимости от типа окраски и выбрать интересующие зоны для последующего электронномикроскопического анализа. Наиболее используемой для тканевых сфероидов является окраска полутонких срезов толуидиновым синим (рис. 2 Ж). Гистологические и гистохимические исследования, например окраска гематоксилином и эозином и азуром и эозином, также получили широкое распространение благодаря простоте и доступности (рис. 2 З).

2.8. Морфометрия и автоматический анализ изображений

Используя клеточные суспензии с разными начальными концентрациями, можно получать сфероиды различного диаметра. Изменения внешнего вида и размера полученных сфероидов последовательно фиксируют в течение 1–2 недель, производя смену питательной среды каждые 2–3 дня. Одной из основополагающих характеристик сфероида является его округлость (англ. roundness, circularity), которая показывает, насколько форма сфероида приближена к идеальному кругу. При этом термин «округлость» употребляют, когда оценивают двухмерную структуру, тогда как более показательными являлись бы термины «сферичность», «шарообразность» (англ. sphericity), описывающие, насколько форма сфероида приближена к идеальному шару. Тканевый сфероид является трехмерной структурой, но на стандартном оптическом инвертированном микроскопе оценить трехмерное строение сфероида не представляется возможным, поэтому при использовании такого оборудования верным будет употребление термина «округлость».

Еще одна характеристика размера сфероидов – их диаметр. Исследования показали, что оптимальным для сфероидов является диаметр, не превышающий 400 мкм, что вытекает из установленного предела пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в невакуляризированных тканях, который равен 200 мкм [23–25]. При превышении этого значения в центре сфероида неизбежно образуется некротическая зона. Удобный инструмент для подсчета диаметров сфероидов – свободное программное обеспечение ImageJ, созданное сотрудниками национальных институтов здравоохранения США (англ. National Institutes of Health, NIH). Программное обеспечение ImageJ позволяет одновременно обрабатывать большое количество фотографий разных форматов и систематизировать данные, облегчая их последующую статистическую обработку.

Необходимо учитывать, что при приготовлении сфероидов разными методами их диаметры могут незначительно отличаться даже при использовании одинаковых концентраций клеточной суспензии. Это связано с геометрией лунки или ячейки, в которой происходит формирование сфероидов, и ошибками дозирования, неизменно возникающими при ручном пипетировании. Опыт показывает, что использование только что приготовленных агарозных форм значительно снижает разброс диаметров сфероидов по сравнению с агарозными формами, приготовленными заранее и предварительно хранившимися в течение 1–2 недель. При изготовлении сфероидов в агарозных формах с использованием высоких концентраций клеточной суспензии размеры лунки физически ограничивают увеличение диаметра сфероидов в ходе культивирования.

Морфометрия тканевых сфероидов позволяет получить количественную информацию об их размерах и форме. Современные методы анализа изображений предоставляют возможность делать это автоматически и статистически достоверно [26].

3. Биологические свойства тканевых сфероидов

Оценка биологических свойств тканевых сфероидов позволяет, с учетом данных по диаметрам и форме, отобрать сфероиды, наиболее подходящие для конкретных задач.

3.1. Изменение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность является важной характеристикой тканевых сфероидов, поэтому оценка статуса клеток в составе сфероида представляет собой необходимый этап анализа, который желательно проводить на протяжении всего времени культивирования. Соотношение живых и мертвых клеток в сфероиде находится в обратной зависимости от размера и возраста сфероида (рис. 3 А). Обычно чем больше концентрация клеток в сфероиде и продолжительнее период культивирования, тем больше вероятность появления некротической центральной зоны. Данные по жизнеспособности клеток помогают выбрать оптимальный срок использования сфероида, который для большинства клеток составляет 3–4 дня. Существуют и исключения из этого правила: например, для сфероидов, приготовленных из первичных хондроцитов барана или первичных остеобластов человека, оптимальным возрастом считается 7–14 дней, когда внеклеточный матрикс накапливается в достаточном количестве и значительно возрастает прочность сфероида, что особенно важно для хрящевой и костной ткани [27].

3.2. Изменение размера сфероидов

В ходе культивирования сфероиды могут менять свой диаметр: демонстрировать постепенное его уменьшение (рис. 3 Б) или увеличение (рис. 3 В). В частности, компактизации подвержены сфероиды,

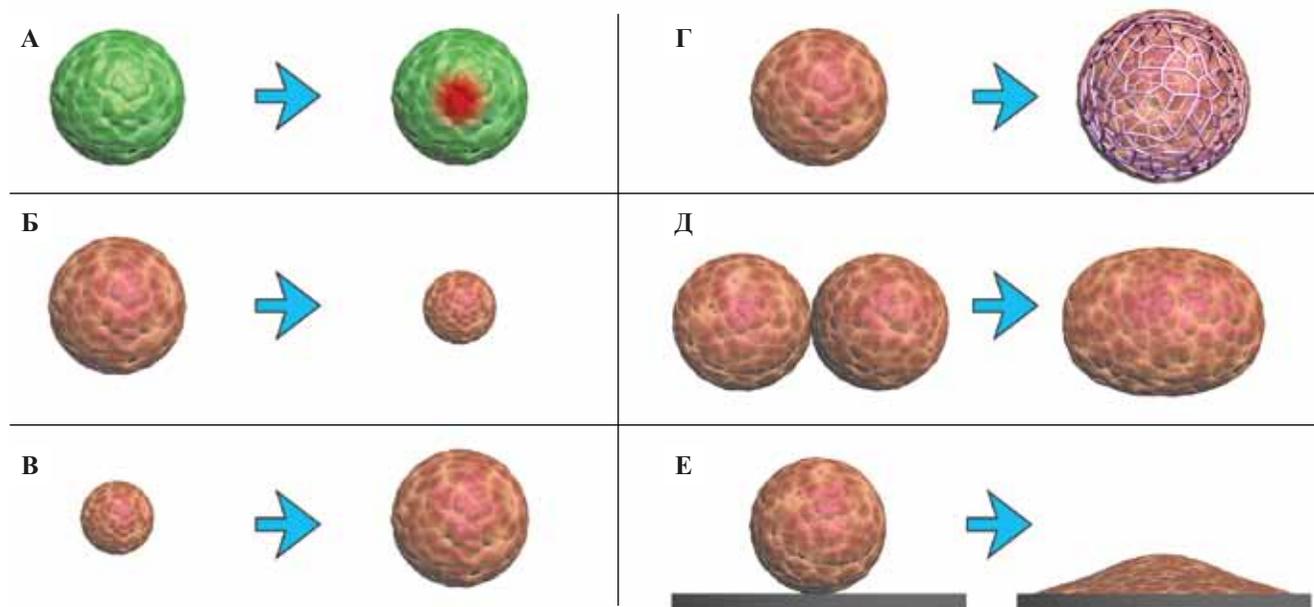


Рис. 3. Характеристики тканевых сфероидов: А – в сфероиде выделяют несколько зон по жизнеспособности, при превышении оптимального диаметра 400 мкм в центре часто формируется некротическая зона; Б – уменьшение размера сфероида (компактизация); В – увеличение размера сфероида; Г – накопление внеклеточного матрикса внутри сфероида; Д – слияние сфероидов; Е – распластывание сфероида на адгезивной поверхности

Fig. 3. The properties of tissue spheroids: А – the gradient of viability zones, and when the optimal diameter of 400 μm is exceeded, a central necrotic zone is often formed; Б – reduction of the spheroid size or compaction; В – increase in the size of the spheroid; Г – extracellular matrix accumulation; Д – tissue spheroids fusion; Е – spreading on the adhesive surface

сформированные из первичных хондроцитов и остеобластов барана и первичных фибробластов человека [14]. Уменьшение размера сфероидов может быть следствием разных факторов – компактизации клеток в составе сфероидов, клеточной гибели – и требует дальнейшего изучения. Постепенное увеличение диаметра характерно для большинства сфероидов, состоящих из эпителиальных клеток, например линии НЕК 293 (клеточная линия эмбриональных почек человека), и связано в первую очередь с сохранением пролиферации клеток в составе сфероида, отсутствием компактизации и синтезом компонентов внеклеточного матрикса. Похожую динамику роста также демонстрируют некоторые сфероиды из раковых клеток, например клеток MCF7 (клеточная линия аденокарциномы протоков молочной железы) и OVCAR8 (клеточная линия карциномы яичника) [28].

3.3. Синтез и накопление внеклеточного матрикса

Клетки в составе сфероида способны синтезировать внеклеточный матрикс, обеспечивающий механическую поддержку и миграцию клеток, а также транспорт различных соединений (рис. 3 Г). Характер и количество матрикса зависят от типа клеток и времени культивирования тканевых сфероидов, а также от добавления активных соединений, стимулирующих его синтез. Так, для тканевых сфероидов из первичных хондроцитов барана характерно значительное накопление внеклеточного матрикса при продолжительном культивировании. При этом синтезируемый матрикс является тканеспецифичным и в случае сфероидов из хондроцитов состоит преимущественно из коллагена типа II и агрекана, характерных для гиалинового хряща [29]. Для тканевых сфероидов из первичных гладкомышечных клеток крысы показано накопление коллагена типов I и IV, эластина и фибронектина [30]. Накопление внеклеточного матрикса также можно использовать как доказательство тканеспецифичной дифференцировки клеток внутри сфероида.

3.4. Слияние и распластывание сфероидов на адгезивной поверхности

Помещенные рядом тканевые сфероиды способны сливаться друг с другом с образованием единого конструкта (рис. 3 Д). Скорость слияния зависит от используемого типа клеток и времени культивирования сфероидов. Способность к слиянию – важнейшее свойство тканевых сфероидов, позволяющее использовать их в области трехмерной биопечати в качестве строительных блоков. Оценка кинетики слияния тканевых сфероидов *in vitro* позволяет прогнозировать поведение конструкта после имплантации *in vivo* и является важным этапом характеристики сфероидов.

Тканевые сфероиды, помещенные на адгезивную поверхность, способны прикрепляться к ней и распластываться с образованием одного или нескольких слоев клеток (рис. 3 Е). В качестве адгезивного материала

могут использоваться пластиковые покрытие чашек Петри, многолуночных планшетов, биосовместимый матрикс, полученный методом электроспиннинга, и другие субстраты. Было показано, что тканевые сфероиды, полученные из первичных фибробластов человека, прикрепляются к адгезивному матриксу из биосовместимого полиуретана за 4 часа и полностью распластываются на нем в течение 7 дней, а сфероиды из клеток H-1975 (клеточная линия аденокарциномы легкого) – в течение 36 часов [31, 32]. Оценка кинетики распластывания тканевых сфероидов позволяет охарактеризовать их способность восстанавливать структуру поврежденной ткани, что особенно важно для замещения кожных дефектов.

Если в сфероиде присутствует значительное количество нежизнеспособных клеток, расположенных на периферии, процесс слияния замедляется или совсем прекращается. Таким образом, тест на слияние может быть использован как косвенный метод оценки жизнеспособности клеток в сфероиде. Кинетику слияния обычно исследуют на неадгезивной поверхности, в противном случае одновременно со слиянием начинается распластывание, что полностью компрометирует процесс.

4. Заключение

Число методов получения тканевых сфероидов за последние десятилетия значительно увеличилось, однако до сих пор только некоторые из них позволяют получать сфероиды единого диаметра и формы в большом количестве. Для использования тканевых сфероидов в биопечати и при разработке новых лекарственных средств необходима их детальная предварительная характеристика. Выбор метода исследования зависит как от типа ткани, так и от цели исследования, при этом наиболее полно охарактеризовать тканевые сфероиды можно, комбинируя различные методы.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – А.А.Г., В.А.М

Сбор и обработка материала – Ю.Д.Х.

Статистическая обработка – Ф.Д.С.П.

Написание текста – А.А.Г.

Редактирование – Е.А.Б., Е.В.К.

Литература/References

1. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*. 2009;30(12):2164–74. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.084.
2. Laschke MW, Menger MD. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol*. 2017;35(2):133–44. doi:10.1016/j.tibtech.2016.08.004.
3. Fennema E, Rivron N, Rouwkema JC, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(2),108–15. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

4. Wang J, Miao Y, Huang Y, Lin B, Liu X1, Xiao S et al. Bottom-up Nanoencapsulation from Single Cells to Tunable and Scalable Cellular Spheroids for Hair Follicle Regeneration. *AdvHealthc Mater.* 2018;7(3). doi:10.1002/adhm.201700447.
5. Lee SI, Ko Y, Park JB. Evaluation of the maintenance of stemness, viability, and differentiation potential of gingiva-derived stem-cell spheroids. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2017;13(5):1757–64. doi:10.3892/etm.2017.4194.
6. Lin H, Li Q, Lei Y. Three-dimensional tissues using human pluripotent stem cell spheroids as biofabrication building blocks. *Biofabrication.* 2017;9(2):025007. doi:10.1088/1758-5090/aa663b.
7. Bulanova EA, Koudan EV, Degosserie J, Heymans C, Pereira FD, Parfenov VA et al. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct. *Biofabrication.* 2017;9(3):034105. doi:10.1088/1758-5090/aa7fdd.
8. Wang S, Wang X, Boone J, Wie J, Yip KP, Zhang J et al. Application of Hanging Drop Technique for Kidney Tissue Culture. *Kidney and Blood Pressure Research.* 2017;42(2):220–31. doi:10.1159/000476018.
9. Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(3):559–67. doi:10.1089/ten.tea.2007.0434.
10. Santos JM, Camões SP, Filipe E, Cipriano M, Barcia RN, Filipe M et al. Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):90. doi:10.1186/s13287-015-0082-5.
11. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol-Bioeng.* 2003;83(2):173–80. doi:10.1002/bit.10655.
12. Cui X, Dini S, Dai S, Bi J, Binder BJ, Green JEF et al. A mechanistic study on tumour spheroid formation in thermosensitive hydrogels: experiments and mathematical modelling. *RSC Adv.* 2016;6:73282–91. doi:10.1039/c6ra11699j.
13. Howes AL, Richardson RD, Finlay D, Vuori K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. *PLoS One.* 2014;9(9):e108283. doi:10.1371/journal.pone.0108283.
14. Koudan EV, Korneva JV, Karalkin PA, Gladkaya IS, Gryadunova AA, Mironov VA et al. The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology. *3D Printing and Additive Manufacturing.* 2017;4(1):53–60. <http://doi.org/10.1089/3dp.2016.0044>.
15. Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ et al. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2011;32(35):9401–14. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.075.
16. Chen K, Wu M, Guo F, Li P, Chan CY1, Mao Z et al. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip.* 2016;16(14):2636–43. doi:10.1039/c6lc00444j.
17. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Frontiers in Physiology.* 2017;8:605. doi:10.3389/fphys.2017.00605.
18. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp.* 2011;51:e2720. doi:10.3791/2720.
19. Frey O, Misun PM, Fluri DA, Hengstler JG, Hierlemann A. Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nature Communications.* 2014;5(1):4250. doi:10.1038/ncomms5250.
20. Belair DG, Wolf CJ, Wood C, Ren H, Grindstaff R, Padgett W et al. Engineering human cell spheroids to model embryonic tissue fusion in vitro. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184155. doi:10.1371/journal.pone.0184155.
21. Ishiwata T, Hasegawa F, Michishita M, Sasaki N, Ishikawa N, Takubo K et al. Electron microscopic analysis of different cell types in human pancreatic cancer spheres. *Oncol Lett.* 2017;15(2):2485–90. doi: 10.3892/ol.2017.7554.
22. No DY, Lee SA, Choi YY, Park D, Jang JY, Kim DS et al. Functional 3D Human Primary Hepatocyte Spheroids Made by Co-Culturing Hepatocytes from Partial Hepatectomy Specimens and Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2012;7(12):e50723. doi:10.1371/journal.pone.0050723.
23. Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):821–3. doi:10.1038/nbt0705-821.
24. Kinney MA, Hookway TA, Wang Y, McDevitt TC. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(2):352–67. doi:10.1007/s10439-013-0953-9.
25. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008;26(8):434–41. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.009.
26. Shimoto T, Zhang XY, Akieda S, Ishikawa A, Higaki H, Nakayama K. Analysis of Cell Spheroid Morphological Characteristics Using the Spheroid Morphology Evaluation System. *Journal of Robotics and Mechatronics.* 2018;30(5):819–26. doi: 10.20965/jrm.2018.p0819.
27. Restle L, Costa-Silva D, Lourenço ES, Bachinski RF, Batista AC, Linhares ABR et al. A 3D Osteoblast In Vitro Model for the Evaluation of Biomedical Materials. *Adv Mater Sci Eng.* 2015;2015:268930. doi:10.1155/2015/268930.
28. Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget.* 2016;7(13):16948–61. doi: 10.18632/oncotarget.7659.
29. Omelyanenko NP, Karalkin PA, Bulanova EA, Koudan EV, Parfenov VA, Rodionov SA et al. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro. *Cartilage.* 2018 Sep 15:1947603518798890. doi:10.1177/1947603518798890.
30. Casco M, Olsen T, Herbst A, Evans G, Rothermel T, Pruett L et al. Iron Oxide Nanoparticles Stimulates Extra-Cellular Matrix Production in Cellular Spheroids. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(1):pii:E4. doi:10.3390/bioengineering4010004.

31. *Chen D, Yang L, Chen X, Zhang X, Liu Y, Guo Z et al.* Automated contour analysis of multi-cellular spheroids spreading through high content imaging. *Phys Biol.* 2018;15(2):026006. doi:10.1088/1478-3975/aaa27b.
32. *Koudan EV, Bulanova EA, Pereira F DAS, Parfenov VA, Kasyanov VA, Hesuani I YD et al.* Patterning of tissue spheroids biofabricated from human fibroblasts on the surface of electropun polyurethane matrix using 3D bioprinter. *Int J Bioprint.* 2016;2(1):45–52. doi:10.18063/IJB.2016.01.007.
33. *Tseng H, Gage JA, Desai PK, Haisler WL, Shah J, Li W et al.* Luminescent Viability Assays in Magnetically Bioprinted 3D Cultures. *Promega Pubhub.* 2015;9(15):1–9.
34. *Rane TD, Armani AM.* Two-Photon Microscopy Analysis of Gold Nanoparticle Uptake in 3D Cell Spheroids. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167548. doi:10.1371/journal.pone.0167548.

Информация об авторах/Author information

Анна Александровна Грядунова – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», аспирантка Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Anna A. Gryadunova – Junior Researcher, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», postgraduate student, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-5189-8530>

Елена Анатольевна Буланова – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Elena A. Bulanova – Candidate of Biological Sciences, Head of the Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-8460-3113>

Кудан Елизавета Валерьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Elizaveta V. Kudan – Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-9377-8118>

Фредерико Давид Сена Перейра – инженер лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Frederico D.A.S. Pereira – Engineer, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0002-0735-4245>

Юсеф Джоржевич Хесуани – управляющий партнер лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Yusef D. Hesuani – Managing Partner, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-8795-893X>

Владимир Александрович Миронов – кандидат медицинских наук, научный руководитель лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», ведущий научный сотрудник Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Vladimir A. Mironov – Candidate of Medical Sciences, Head of Research, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», Leading Researcher, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-5029-1462>

К вопросу о морфологических особенностях себорейного кератоза

А.К. Александрова, В.А. Смольяникова

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Несмотря на то, что себорейный кератоз является наиболее распространенной доброкачественной эпителиальной опухолью кожи, до настоящего времени его единой морфологической классификации нет.

Цель исследования: изучение гистологических типов себорейного кератоза.

Материалы и методы. Материалом для гистологического исследования послужили опухоли кожи от 300 пациентов. В 36,3% случаев забор материала проводился с мест, которые легко подвергаются воздействию солнечного света, в 63,7% – с закрытых мест.

Результаты. Распределение по гистологическим типам было следующим: акантоотический тип – 194 случаев себорейного кератоза (64,7%), аденоидный – 42 (14%), клональный – 34 (11,3%), раздраженный – 30 (10%). На закрытых, менее подверженных воздействию УФ местах достоверно чаще выявлялся акантоотический тип себорейных кератом ($p=0,00001$), а на подверженных УФ излучению – аденоидный и раздраженный ($p=0,017$, $p=0,00001$). Для 227 случаев себорейного кератоза (75,7%) были характерны скудные периваскулярные лимфоцитарно-моноцитарные инфильтраты. Выраженное воспаление с присутствием нейтрофильных лейкоцитов достоверно чаще встречалось при раздраженном типе – 70% ($p=0,00001$). Было выделено три типа распределения пигмента в опухоли. При раздраженном типе и выраженном воспалении в себорейном кератозе встречался исключительно I тип пигментации, что достоверно отличало его от других типов ($p=0,00001$).

Выводы. Для морфологического диагноза «себорейный кератоз» обязательным является один признак – базалоидность клеток опухоли. Наличие в большинстве кератом признаков нескольких гистологических типов свидетельствует об их единой этиологии. Единственный признак, присутствующий только в определенных типах опухоли (очаги плоскоклеточной дифференцировки), позволяет нам говорить об обычной форме себорейного кератоза и себорейном кератозе с плоскоклеточной дифференцировкой. Механизм формирования данных очагов включает в себя воздействие экзогенных факторов (УФ излучение, травмы), что приводит к другому развитию и прогнозу опухоли.

Ключевые слова: себорейный кератоз, гистологическое исследование, плоскоклеточные включения

Для корреспонденции: Александра Константиновна Александрова. E-mail: veter278@rambler.ru

Для цитирования: А.К. Александрова, В.А. Смольяникова. К вопросу о морфологических особенностях себорейного кератоза. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 21-7. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-21-27

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 21.03.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

On the question of morphological features of seborrheic keratosis

A.K. Alexandrova, V.A. Smolyannikova

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Although seborrheic keratosis is the most common benign epithelial tumor of the skin, there is no single morphological classification.

Objective: to study the histological types of seborrheic keratosis.

Materials and methods. Skin tumors from 300 patients served as material for histological examination. In 36.3% of the material was taken from places that are easily exposed to sunlight, in 63.7% – from the closed places.

Results: The distribution according to histological types was as follows: acanthotic type – 194 cases of seborrheic keratosis (64.7%), adenoidal – 42 (14%), clonal – 34 (11.3%) and irritated – 30 (10%). On closed, less exposed to UV places, the acanthotic type was significantly more often detected ($p=0.00001$), and adenoid and irritated ($p=0.017$, $p=0.00001$) were exposed to UV radiation. For 227 cases of seborrheic keratosis (75.7%),

poor dermal perivascular lymphocytic-mononuclear infiltrates were characteristic. Severe inflammation, with the presence of neutrophilic leukocytes, was significantly more common in irritated type (70%) ($p=0.00001$). It was allocated III types of distribution of pigment in the tumor. In irritated type and severe inflammation in the seborrheic keratosis, only type I pigmentation was encountered, which reliably distinguished it from other types ($p=0.00001$).

Conclusions: For the morphological diagnosis of «seborrheic keratosis», one feature is mandatory – the basaloid of tumor cells. The presence of signs of several histological types in most keratomas indicates their uniform etiology. The only sign that is present only in certain types of tumors is the foci of squamous differentiation, which allows us to speak about the usual form of seborrheic keratosis and seborrheic keratosis with squamous differentiation. The mechanism of formation of these foci includes the impact of exogenous factors, which leads to another development and prognosis of the tumor.

Key words: seborrheic keratosis, histological examination, squamous eddies

Corresponding author: Alexandra K. Alexandrova. E-mail: veter278@rambler.ru

For citation: A.K. Alexandrova, V.A. Smolyannikova. On the question of morphological features of seborrheic keratosis. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 21-27. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-21-27

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21.03.2019. **Accepted** 04.06.2019

Себорейный кератоз (*keratoma senile*, старческая бородавка) (СК) – наиболее распространенная доброкачественная эпителиальная опухоль кожи, существующая во множестве клинических вариантов [1, 2]. До последнего времени некоторыми исследователями СК рассматривался не как опухоль, а как результат реактивной гиперплазии эпидермиса, исходя из того, что при сравнительной геномной гибридизации не было обнаружено хромосомных aberrаций, характерных почти для каждого типа опухоли человека [3, 4]. Геном СК оказался стабилен. В настоящее время распространен взгляд на СК как на опухоль, обусловленную пролиферацией клона соматически мутировавших клеток [5].

Проявляется заболевание на ранней стадии пятнами желто-коричневой окраски, которые постепенно превращаются в выпуклые бляшки, как будто «приклеенные» к коже. Они мягкой консистенции, с гладкой или веррукозной поверхностью, с салым блеском. В центральной части себорейных кератом часто видны множественные роговые кисты. Диаметр образований может варьировать от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. У пациентов может быть несколько солитарных себорейных кератом, но чаще очаги множественные. У афроамериканцев СК лица носит название «папулезный черный дерматоз» и встречается в 30–35% случаев [2, 6]. Кератомы растут медленно, их размеры и количество с годами могут значительно увеличиваться, самопроизвольно не исчезают, детали контроля их клеточного цикла не изучены. Единой классификации СК по клиническому признаку нет. По морфологическому признаку классификации различны, почти в каждой исследовательской работе предлагается разделение СК на разные гистологические типы. Так, отечественные авторы выделяют гиперкератотический, акантотический, аденоидный, клональный и смешанный гистологические типы опухоли [1]. В зарубежной практике чаще всего описывают шесть гистологических типов: акантотический; аденоидный, или рети-

кулярный; гиперкератотический, или папилломатозный; клональный; воспаленный; раздраженный [7, 8]. A.F. Hood et al. [9] к СК наряду с перечисленными выше гистологическими типами относят также инвертирующий фолликулярный кератоз, H.S. Kim et al. [10] – штукатурный кератоз, D. Elder et al. [11] – меланоакантому, папулезный черный дерматоз и штукатурный кератоз, N.K. Roh et al. [12] – меланоакантому и смешанный вариант опухоли. K.L. Wolff et al. [6] выделяют клинико-морфологические варианты СК: простой, мягкие фибромы, ретикулярный, клональный, раздраженный, СК с плоскоклеточной атипией, меланоакантому, штукатурный кератоз и черный папулезный дерматоз. Кроме того, в последнее время были описаны два редких гистологических типа СК: с содержанием муцина в клетках (адамантиноидный) и расположение в опухоли базалоидных кератиноцитов по типу «псевдорозеток» [7].

Для всех гистологических форм СК характерны разной степени выраженности гиперкератоз, акантоз, папилломатоз и патогномичный симптом – роговые и псевдороговые кисты. В себорейных кератомах присутствуют три основных вида клеток – базалоидные кератиноциты, шиповатые клетки и меланоциты. Интенсивность меланинового пигмента варьирует от почти полного отсутствия до сильной степени [1, 11].

Цель исследования: изучение гистологических типов СК.

Материалы и методы

Набор пациентов осуществлялся на базе медицинской санитарной части Московского института теплотехники в период с 2013 по 2017 год. В исследование были включены 300 человек с клиническими проявлениями СК, самостоятельно обратившихся за медицинской помощью с целью диагностики и удаления новообразований кожи: 228 женщин (76%) и 72 мужчины (24%) в возрасте от 45 до 77 лет. При проведении

клинического обследования и опроса пациентов использовали индивидуальную регистрационную карту. Морфологическое исследование проводилось на базе кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова. Материалом для гистологического исследования послужили опухоли кожи от 300 пациентов. Мы применяли эксцизионный вариант биопсии, при котором хирургическим путем под местной анестезией 0,5% раствором новокаина иссекалась вся опухоль в пределах здоровых тканей, отступая от ее края не менее чем на 0,3–0,5 см. Операционное вмешательство проводилось с письменного информированного согласия пациентов. Для иссечения выбирали наиболее характерный элемент СК в виде плоского умеренно пигментированного очага овальной формы не более 2 см в диаметре с гиперкератотической или папилломатозной поверхностью. 109 себорейных кератом (36,3%) были удалены с мест, которые легко подвергаются воздействию солнечного света: кожи лица, шеи, зоны декольте и кожи голени; 191 себорейная кератома (63,7%) – с мест, чаще закрытых: туловища и живота, нижней трети спины и боковых поверхностей туловища.

Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина и обрабатывали по стандартной методике с последующей заливкой в парафиновые блоки, из которых готовили гистологические препараты с окраской гематоксилином и эозином.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей были проведены с использованием статистического пакета программ Statistica for Windows v.10 и SPSS v21. Для сравнения качественных параметров

применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (95% точности).

Результаты и обсуждение

При анализе 300 гистологических препаратов с клиническим диагнозом «себорейный кератоз» распределение по гистологическим типам было следующим: акантотический тип составил 194 случаев СК (64,7%), аденоидный – 42 (14%), клональный – 34 (11,3%), раздраженный – 30 (10%). Определить гистологический тип СК можно было только при морфологическом исследовании из-за отсутствия особенностей клинической картины, характерной для какого-либо типа. (рис. 1–4).

С учетом того, что существует много разных морфологических классификаций СК, выбор именно данных гистологических типов при детальном гистологическом исследовании был обусловлен несколькими причинами. Так, мы отдельно не выделяли гиперкератотическую форму СК. Гиперкератоз разной степени выраженности являлся обязательным для всех форм СК. Описание гистологической картины гиперкератотического типа СК – наличие возвышений эпидермиса по типу «церковных шпилей», слабовыраженная базалоидность клеток или ее полное отсутствие, отсутствие роговых кист – в литературе не имеет отличий от описаний старческой кератомы или кератопапилломы, а также от поражений при акродерматите верруциформном Гопфа и штукатурном кератозе [11]. Также мы не выделяли в отдельный тип воспаленный СК, а наличие воспаления в дерме описывали при каждом гистологическом типе.

В нашем исследовании не было пациентов с меланоакантомой. Вызывает большое сомнение, является

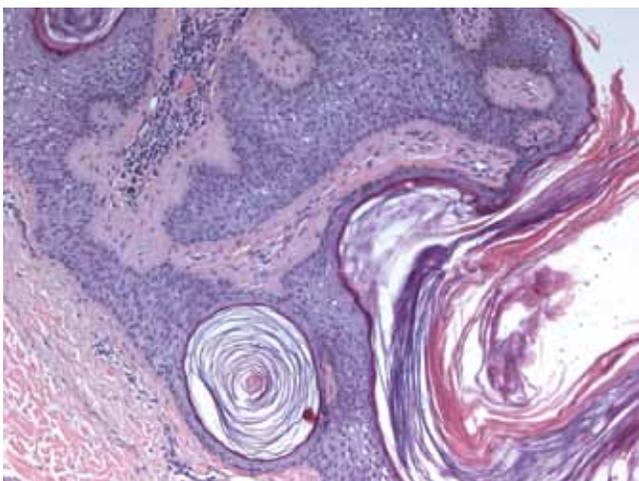


Рис. 1. Себорейный кератоз, акантотический тип. Выраженный гиперкератоз, акантоз, папилломатоз. Единичные истинные роговые кисты. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 1. Seborrheic keratosis. Acanthotic type. Severe hyperkeratosis, acanthosis, papillomatosis. Single true horn cysts. H&E. $\times 100$

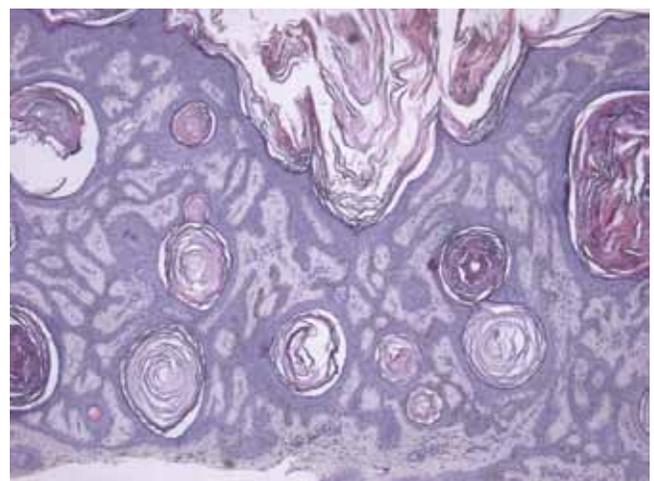


Рис. 2. Себорейный кератоз. Аденоидный тип. Тонкие тяжи из 2–3 рядов базалоидных клеток, формирующие петлистую сеть. Множественные истинные роговые кисты. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 50$

Fig. 2. Seborrheic keratosis. Adenoidal type. Thin yarns of 2–3 rows of basaloid cells that form a looped net. Multiple true horn cysts. H&E. $\times 50$

ли она подтипом СК. По данным литературы, меланоакантома встречается чаще всего у темнокожих пациентов (90,9%) женщин (69,7%), на слизистых ротовой полости (64,7%) [13], в возрасте 28–43 лет [14] в отличие от СК, который крайне редко бывает на слизистых и развивается после 40 лет.

Черный папулезный дерматоз в связи с отсутствием пациентов негроидной расы нами исследован не был.

Важно отметить, что в большинстве случаев в каждом из образцов СК можно было найти характерные особенности нескольких типов. Так, при аденоидном типе при серийных срезах имелись участки акантотического типа, и, наоборот, при клональном типе – акантотического и раздраженного (в виде единичных очагов плоскоклеточной дифференцировки), при раздраженном типе – акантотического. Тем не менее выделять смешанные виды опухоли мы не стали, так как всегда явно преобладал определенный тип, остальные типы лишь единичными характерными чертами дополняли его.

Нами были проанализированы гистологические типы в зависимости от месторасположения СК (табл. 1)

Таблица 1 / Table 1

**Гистологические типы себорейного кератоза
в зависимости от локализации опухоли
Histological types of seborrheic keratosis depending on the
tumor location**

Гистологический тип	Локализация			
	без УФ излучения		УФ излучение	
	абс.	%	абс.	%
Число пациентов	191		109	
Акантотический тип	145	75,9	49	44,9*
Аденоидный тип	20	10,5	22	20,2*
Клональный тип	23	12,0	11	10,1
Раздраженный тип	3	1,6	27	24,8*

*Достоверные различия с локализацией без УФ, $p < 0,05$

Так, при удалении себорейных кератом с закрытых мест, менее подверженных воздействию УФ, достоверно чаще выявлялся акантотический тип ($p = 0,00001$), а наиболее распространенными гистологическими типами на подверженных УФ излучению местах были аденоидный и раздраженный ($p = 0,017$ и $p = 0,00001$, соответственно). Таким образом, раздраженный тип СК встречался с большей частотой на подверженных солнечному излучению участках – 90%, что предполагает роль УФ излучения в его развитии. А вот аденоидный тип СК, который многие исследователи считают возникающим из сенильного лентиго и описывают только на подверженных солнечному излучению участках ту-

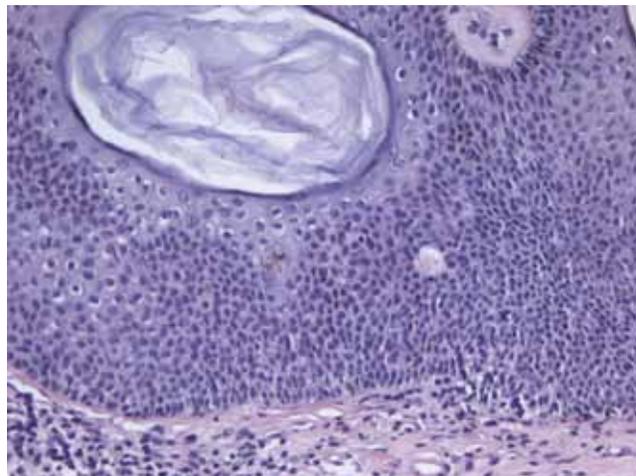


Рис. 3. Клональный себорейный кератоз. Скопления в виде гнезд мелких базалоидных клеток. Единичная роговая киста крупных размеров. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 3. Clonal seborrheic keratosis. The nests of small basaloid cells. Single large horn cyst. H&E. $\times 200$

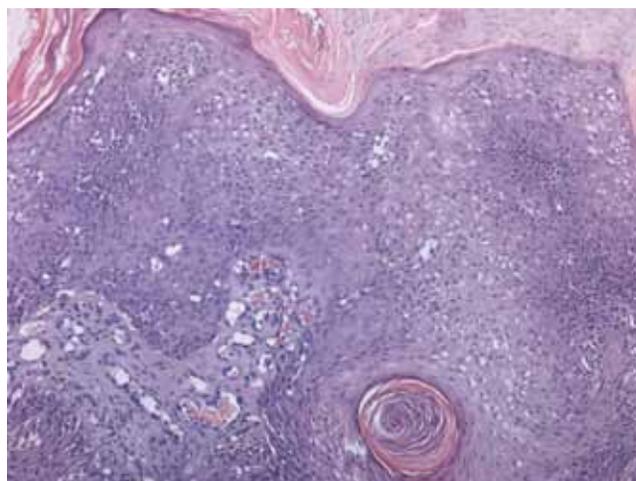


Рис. 4. Раздраженный себорейный кератоз. Наличие наряду с базалоидными клетками скоплений циркулярно расположенных клеток с эозинофильной цитоплазмой, напоминающих истинные «роговые жемчужины». Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 4. Irritated seborrheic keratosis. The presence of clusters of circularly located cells with eosinophilic cytoplasm resembling true «horn pearls» alongside basaloid cells. H&E. $\times 100$

ловища [11, 12], отмечен лишь в 52,4% случаев. Наши данные совпадают с данными авторов о наиболее распространенном виде СК – акантотическом, вне зависимости от места локализации [2, 12].

В исследовании мы провели анализ основных морфологических признаков СК – гиперкератоза, акантоза, пигментации, наличие воспаления и роговых кист, чтобы установить, есть ли характерные отличия при выделенных гистологических типах. Во всех препаратах опухоль содержала три вида клеток: преимущественно

базалоидные, незначительное количество шиповатых и единичные меланоциты. Гиперкератоз присутствовал в виде ортокератоза, акантотические тяжи опухолевых клеток были различной величины – от двухрядных, тонких при аденоидном типе опухоли до широких при других гистологических типах.

Для СК в большинстве случаев – 227 себорейных кератом (75,7%) – были характерны скудные периваскулярные лимфоцитарно-моноцитарные инфильтраты в строме опухоли, особенно в папилломатозных выростах, а также единичные очаги в нижележащей дерме.

Более выраженная воспалительная реакция в виде периваскулярных и очаговых (более двух очагов в дерме) инфильтратов встречалась в 47 себорейных кератомах (15,7%), и только в 26 опухолях (8,7%) наблюдался мощный воспалительный лимфоцитарно-моноцитарный инфильтрат вплоть до сетчатого слоя дермы. Для 88,7% себорейных кератом акантотического, 67,6% клонального и 66,7% аденоидного типов было характерно слабое воспаление. Выраженное воспаление достоверно чаще встречалось при раздраженном типе СК – в 70% случаев в отличие от остальных гистологических типов ($p=0,00001$). Присутствие нейтрофильных лейкоцитов наблюдалось в 16 СК (раздраженный тип) с выраженным воспалением. В семи себорейных кератомах (три клонального, три акантотического и одна аденоидного типа) с умеренной и выраженной степенью воспаления наличие нейтрофильных лейкоцитов в строме опухоли сочеталось с начальным формированием отдельных очагов плоскоклеточной дифференцировки.

Это позволило нам предположить определенную роль воспалительной реакции с наличием именно нейтрофильных лейкоцитов в формировании очагов плоскоклеточной дифференцировки, а затем раздраженного типа СК. При данном гистологическом типе дифференцировка клеток опухоли идет иначе, чем при других типах, имеет место значительное преобладание шиповатых клеток над базалоидными. О роли экзогенных факторов – хирургической травмы, кротонного масла – в развитии раздраженного СК имеются данные и в литературе [11].

Кроме того, все себорейные кератомы с наличием формирующихся очагов плоскоклеточной дифференцировки были расположены на открытых участках кожи, подверженных влиянию УФ излучения. Таким образом, в патогенезе раздраженного типа СК значимую роль играет именно сочетание двух факторов – постоянное хроническое травмирование опухоли или острая травма в сочетании с хроническим УФ излучением. Одного из этих факторов недостаточно, так как при удалении с открытых мест в себорейных кератомах присутствовало и слабое, и умеренное воспаление без признаков плоскоклеточной дифференцировки.

Известно, что негативный эффект от УФ облучения включает прямые воздействия на кератиноциты, такие как индукция интерлейкинов IL-1 α , IL-6 и фактора не-

кроза опухоли, ФНО- α , приводящие к инфильтрации кожи фагоцитами [15]. Возрастает уровень медиаторов воспаления, которые увеличивают проницаемость капилляров, приводя к активации нейтрофилов и других фагоцитирующих клеток в коже, продуцентов активных форм кислорода, что способствует оксидативному повреждению ДНК и активации транскрипционных факторов [16]. Видимо, частичный регресс раздраженных форм СК, который наблюдается в клинической картине в виде отпадения большей части опухоли при стихании воспаления, происходит за счет усиленной дифференцировки одних клеток и активации апоптоза других, поврежденных. Тем не менее полного регресса опухоли никогда не происходит, и с течением времени рост возобновляется. Важно, что во всех случаях в себорейных кератомах, в отличие от непораженной кожи, присутствует лимфоцитарно-моноцитарный инфильтрат, чаще всего периваскулярно, в нижележащей дерме и строме опухоли. Наиболее часто он линейной формы, иногда в виде нескольких умеренных округлых очагов в дерме, иногда полностью с захватом сосочкового слоя дермы до сетчатого слоя, что говорит об участии иммунной системы.

Отложение пигмента меланина в себорейных кератомах носило неравномерный, часто очаговый характер. Так, в серийных срезах одной опухоли можно было встретить как усиленное отложение пигмента в виде комплекса меланосом над апикальными полюсами ядер клеток, так и его почти полное отсутствие. Мы выделили три основных типа пигментации.

I тип. Слабая пигментация отдельных клеток опухоли, преимущественно в области дермоэпидермальной границы или отдельными очагами. Меланин располагался в виде «шапочек» над ядрами клеток и/или в виде единичных отдельных глыбок и меланофагов в дерме и строме опухоли.

II тип. Равномерная пигментация клеток, расположенных на дермоэпидермальной границе, с единичными меланофагами в дерме и строме опухоли или их полным отсутствием.

III тип. Выраженная диффузная пигментация в виде большого количества меланина в клетках, расположенных в основании опухоли и вышележащих слоях, скопления меланина в виде глыбок и меланофагов в дерме и строме опухоли.

Наиболее часто встречался I тип пигментации – 176 случаев СК (58,7%); II тип – 79 (26,3%), III тип – 45 (15%). Интересно, что III тип пигментации был только при клональном (52,9%) и акантотическом (13,9%) типе СК, тогда как II тип был характерен для аденоидного типа СК – 38,1% и для акантотического – 53,6%. При раздраженном типе и выраженном воспалении в себорейных кератомах регистрировался исключительно I тип пигментации, что достоверно отличало его от других типов СК ($p=0,00001$). Кроме того, даже слабая пигментация клеток на дермоэпидермальной границе была лишь там, где в нижележащей дерме не прилегал

воспалительный инфильтрат. При этом в сосочковом слое дермы можно было найти единичные глыбки меланина. III тип пигментации, когда пигмент был и в клетках опухоли, и в нижележащей дерме, только в 3,7% встречался при удалении себорейных кератом с мест, подверженных УФ излучению, что достоверно реже, чем при удалении с мест, защищенных от солнечного света, – 21,5% ($p=0,00001$). В то же время I тип пигментации достоверно чаще регистрировался в себорейных кератомах, удаленных с подверженных УФ излучению мест ($p=0,0001$). Об этом свидетельствуют и данные клинических наблюдений: большинство наиболее пигментированных себорейных кератом находилось у пациентов на коже живота и нижней трети спины. Таким образом, при СК в отличие от неизмененного эпидермиса стимуляции меланогенеза при воздействии УФ излучения не происходило, что свидетельствует о нарушении эпидермального баланса между стимуляторами и ингибиторами меланогенеза – паракринными цитокинами. Необходимо учесть и факт более выраженной лимфоцитарно-моноцитарной реакции в СК, удаленных с мест, подверженных УФ ($p=0,0000001$), что приводит к излишней экспрессии в СК ФНО- α и других провоспалительных цитокинов, ингибиторов меланогенеза, в сочетании с повышенным содержанием эндотелина 1 – известного митогена для меланоцитов и стимулятора меланогенеза [17].

Роговые кисты при СК в большинстве своем были истинными, расположенными в толще или между тяжками базалоидных клеток. Также присутствовали псевдокисты в виде скопления роговых масс в инвагинациях эпидермиса. Размеры истинных кист варьировали независимо от гистологического типа СК – от мелких до огромных, занимающих большую часть СК, от базальной мембраны до рогового слоя. Часто истинные кисты, достигая больших размеров, объединялись с псевдокистами, расположенными на поверхности.

Для оценки числа кист (только истинных) в каждой себорейной кератоме мы считали наличие более пяти кист на опухоль множественными, менее пяти – единичными.

Множественные кисты встречались в 64% случаях СК, единичные – в 36%. Для всех гистологических форм СК было более характерно наличие множественных кист, что не соответствует данным литературы об отсутствии роговых кист при аденоидных типах СК и их множественности при других формах [11].

Выводы

Исходя из проведенного исследования, для морфологического диагноза «себорейный кератоз» обязательным является один признак – базалоидность клеток опухоли. Таким образом, штукатурный кератоз, а также меланоакантома даже при сходстве клинических проявлений не могут быть отнесены к разновидностям себорейного кератоза. Наличие в большинстве себорейных кератом признаков нескольких гистологических типов

свидетельствует об их единой этиологии. Единственный признак – очаги плоскоклеточной дифференцировки, присутствующий только в определенных типах опухоли, когда выявляется значимое преобладание шиповатых клеток над базалоидными, позволяет нам говорить о себорейном кератозе с плоскоклеточной дифференцировкой, но не с плоскоклеточной атипией. Механизм формирования данных очагов включает в себя воздействие экзогенных факторов, что приводит к другому развитию и прогнозу опухоли. Таким образом, можно говорить об обычной форме себорейного кератоза и себорейном кератозе с плоскоклеточной дифференцировкой.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – А.К.А., В.А.С.
Сбор и обработка материала – А.К.А.
Написание текста – А.К.А.
Редактирование – В.А.С.

Литература/References

1. Цветкова Г.М., Мордовцева В.В., Вавилов А.М., Мордовцев В.Н. Патоморфология болезней кожи. М.: Медицина, 2003. 94 с. [Tsvetkova G. M., Mordovtseva V.V., Vavilov A.M., Mordovtsev V.N. Pathomorphology of skin diseases. M.: Medicina, 2003. 94 p. (In Russ.)].
2. Hafner C, Hartmann A, van Oers JM, Stoehr R, Zwarthoff EC, Hofstaedter F et al. FGFR3 mutations in seborrheic keratoses are already present in flat lesions and associated with age and localization. *Mod. Pathol.* 2007;20(8):895–903. doi: 10.1038/modpathol.3800837
3. Hallermann C, Gunawan B, Bertsch HP. No Chromosomal Imbalances in Seborrheic Keratoses Detectable by Comparative Genomic Hybridization. *J. of Invest. Dermatol.* 2004;123:1204–5. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23476.x
4. Hillen LM, Rennspiess D, Speel EJ, Haugg AM, Winnepenninckx V, Zur Hausen A et al. Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Seborrheic Keratosis. *Front Microbiol.* 2017;9(8):2648. doi: 10.3389/fmicb.2017.02648.
5. Mandinova A, Kolev V, Neel V, Hu B, Stonely W, Lieb J et al. A positive FGFR3/FOXN1 feedback loop underlies benign skin keratosis versus squamous cell carcinoma formation in humans. *J. Clin. Invest.* 2009;119(10):3127–37. doi: 10.1172/JCI38543.
6. Wolff KL, Goldsmith AL, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Lefkell DJ. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, seventh edition. New York: McGraw-Hill Medical, 2013. 1635 p.
7. Requena L, Kutzner H. Seborrheic keratosis with pseudorosettes and adamantinoid seborrheic keratosis: two new histopathologic variants. *J. Cutan. Pathol.* 2006;33(2):42–5. doi: 10.1111/j.1600-0560.2006.00528.x
8. Yoshimi N, Imai Y, Kakuno A, Tsubura A, Yamanishi K, Kurokawa I. Epithelial keratin and filaggrin expression in seborrheic keratosis: evaluation based on histopathological classification. *Int. J. Dermatol.* 2014;53(6):707–13. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05828.x.
9. Hood AF, Kwan TH, Mihm MC, Horn TD. Primer of Dermatopathology, second edition. Little, Brown and company, 1993. 97 p.

10. Kim HS, Park EJ, Kwon IH, Kim KH, Kim KJ. Clinical and histopathologic study of benign lichenoid keratosis on the face. *Am. J. Dermatopathol.* 2013;35(7):738–41. doi: 10.1097/DAD.0b013e318281cd37.
11. Elder D, Elenitsas R, Johnson B, Murphy GF, Xu X. *Lever's histopathology of the skin.* 10th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2009. 795 p.
12. Roh NK, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Clinical and Histopathological Investigation of Seborrheic Keratosis. *Ann Dermatol.* 2016;28(2):152–8. doi: 10.5021/ad.2016.28.2.152.
13. Andrews BT, Trask DK. Oral melanoacanthoma: a case report, a review of the literature, and a new treatment option. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2005;114(9):677–80. doi: 10.1177/000348940511400904
14. Cheng AG, Deubner H, Whipple ME. Melanoacanthoma of the external auditory canal: a case report and review of the literature. *Am. J. Otolaryngol.* 2007;28:433–5. doi: 10.1016/j.amjoto.2006.11.006
15. Снарская Е.С., Рябцева А.А., Сурикова Н.Н. Кумулятивные эффекты воздействия ультрафиолетового излучения на развитие патологии кожи и глаз. *Вестник оптометрии.* 2009;6:53–58 [Snarskaya E.S., Ryabtseva A.A., Surikov N.N. Cumulative effects of exposure to ultraviolet radiation on the development of pathology of the skin and eyes. *Vestnik optometrii.* 2009;6:53–58 (In Russ.)].
16. Muller HK, Woods GM. Ultraviolet Radiation Effects on the Proteome of Skin Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013;990:111–9. doi: 10.1007/978-94-007-5896-4_8.
17. Manaka L, Kadono S, Kawashima M, Kobayashi T, Imokawa G. The mechanism of hyperpigmentation in seborrheic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1alpha and TNF-alpha, which stimulate secretion of endothelin 1. *Br J Dermatol.* 2001;145(6):895–903.

Информация об авторах/Author information

Александра Константиновна Александрова – кандидат медицинских наук, врач-дерматовенеролог, докторант кафедры патологической анатомии им. А.М. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Alexandra K. Alexandrova – Candidate of Medical Science, Doctoral Candidate in the A.M. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
<http://orcid.org/0000-0001-9166-9807>.

Вера Анатольевна Смольяникова – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии им. А.М. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Vera A. Smolyannikova – Doctor of Medical Sciences, Professor of the A.M. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
<https://orcid.org/0000-0002-7759-5378>.

Роль патологического неоангиогенеза в формировании полипов эндометрия и механизмы возникновения аномальных маточных кровотечений

И.А. Иванов¹, А.В. Асатурова¹, Г.Е. Чернуха¹, М.Р. Думановская¹, М.В. Мнихович^{1,2}

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Актуальность. Вопросы о роли неоангиогенеза в формировании полипов эндометрия и механизмах возникновения аномальных маточных кровотечений остаются дискуссионными.

Цель исследования – изучение факторов ангиогенеза, морфологических особенностей полипов эндометрия и их связь с аномальными маточными кровотечениями.

Материалы и методы. Проведен морфометрический анализ 25 полипов, а также ИГХ оценка экспрессии основных маркеров ангиогенеза – CD34, CD105, VEGF-A – в 40 образцах полипов, прилежащем и нормальном эндометрии без признаков патологии, полученных от пациенток с кровотечениями и без них.

Результаты. По сравнению с нормальным эндометрием в полипах наблюдается повышение экспрессии CD34, CD105 и VEGF-A. Методом компьютерной морфометрии установлено, что для полипов эндометрия, проявляющихся маточными кровотечениями, характерны истончение стенки и расширение диаметра сосудов. Указанные патологические изменения находились в прямой зависимости от экспрессии VEGF-A. При этом наличие хронического эндометрита в прилежащем эндометрии было связано с более выраженными морфологическими нарушениями сосудов и повышением уровня VEGF-A.

Выводы. В полипах эндометрия наблюдается активация неоангиогенеза, что может лежать в основе данного заболевания, а также вызывать увеличение диаметра и истончение стенки сосудов, что характерно для пациенток с аномальными маточными кровотечениями.

Ключевые слова: полипы эндометрия, аномальные маточные кровотечения, ангиогенез, CD34, CD105, VEGF-A

Для корреспонденции: Илья Андреевич Иванов. E-mail: doctor.i.ivanov@yandex.ru

Для цитирования: И.А. Иванов, А.В. Асатурова, Г.Е. Чернуха, М.Р. Думановская, М.В. Мнихович. Роль патологического неоангиогенеза в формировании полипов эндометрия и механизмы возникновения аномальных маточных кровотечений. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 28-34. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-28-34

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 24.04.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

The role of pathological angiogenesis in endometrial polyp pathogenesis and abnormal uterine bleeding

I.A. Ivanov¹, A.V. Asaturova¹, G.E. Chernukha¹, M.R. Dumanovskaya¹, M.V. Mnikhovich^{1,2}

¹ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

² Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Abstract. The role of angiogenesis in endometrial polyp formation and appearing of abnormal uterine bleeding is still controversial.

The aim of the study was to evaluate the activity of angiogenic factors, morphological characteristics of endometrial polyps and their association with abnormal uterine bleeding.

Materials and methods. A total of 25 women with and without abnormal uterine bleeding who had histologic confirmation of benign endometrial polyps were recruited into morphometric analysis. 40 samples of polyps, adjacent and normal endometrium were enrolled into immunohistochemical analysis for assessing the expression of angiogenic factors CD34, CD-105 and VEGF-A.

Results. Expression of CD34, CD-105 and VEGF-A was significantly increased in endometrial polyp comparing with normal endometrium. Morphometric analysis revealed abnormally dilated, thin walled capillaries of polyps among women with uterine bleeding. These morphological changes of vessels were in direct proportion to VEGF-A expression. Presence of chronic endometritis was associated with more severe morphologic lesions and higher level of VEGF-A.

Conclusions. Higher expression of angiogenic factors could reflect the important role of angiogenesis in endometrial polyp's formation and cause the pathological changes in blood vessel structure associated with abnormal uterine bleeding.

Key words: endometrial polyps, abnormal uterine bleeding, angiogenesis, CD34, CD105, VEGF-A

Corresponding author: Ilya A. Ivanov. E-mail: doctor.i.ivanov@yandex.ru

For citation: I.A. Ivanov, A.V. Asaturova, G.E. Chernukha, M.R. Dumanovskaya, M.V. Mnikhovich. The role of pathological angiogenesis in endometrial polyp pathogenesis and abnormal uterine bleeding. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 28-34. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-28-34

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 24.04.2019. **Accepted** 04.06.2019

Введение

Полипы эндометрия (ПЭ) являются одной из наиболее распространенных форм внутриматочной патологии и служат причиной аномальных маточных кровотечений (АМК) как в репродуктивном периоде, так и в менопаузе. Для них также характерна высокая частота рецидивов, приводящих к неоднократным оперативным вмешательствам, снижающим качество жизни женщин, повреждающим эндометрий и повышающим риск возникновения внутриматочных синехий и бесплодия [1–4]. Доля ПЭ, манифестирующихся АМК, в зависимости от методов диагностики и возрастных групп, колеблется от 38% до 81,5% [3, 4]. Механизмы, обуславливающие наличие или отсутствие клинической симптоматики при ПЭ, остаются мало изученными. В литературе имеются противоречивые данные о возможной связи АМК с хроническим воспалением, микроэрозиями, тромбозами, ишемическим некрозом капилляров, а также патологическим неоангиогенезом [3–6].

Ангиогенез – это процесс формирования новых кровеносных сосудов из первичной капиллярной сети. Его важными звеньями являются пролиферация и миграция эндотелиальных клеток – внутреннего слоя кровеносных сосудов. Один из ведущих индукторов этих процессов – сосудистый эндотелиальный фактор роста А (VEGF-A), вследствие чего его рассматривают в числе ключевых активаторов ангиогенеза [7, 8]. Маркером пролиферирующего эндотелия является CD105 – белок, который высоко экспрессируется во время роста новых сосудов, например при опухолевых процессах, и служит ключевым элементом, определяющим состояние покоя или активации клеток эндотелия [9]. Активность ангиогенеза можно косвенно определить по числу сосудов – так называемой микрососудистой плотности. Ее количественная оценка осуществляется с помощью маркера CD34, который выявляется в эндотелии как новообразованных, так и находящихся в состоянии покоя сосудов [10]. Существует гипотеза, что патологический неоангиогенез может лежать в основе возникновения не только АМК, но и самого ПЭ. В пользу данного

предположения свидетельствует тот факт, что морфологической основой ПЭ является сосудистая ножка, представляющая собой «клубок» крупных кровеносных сосудов [6, 11, 12]. При этом конкретные звенья ангиогенеза, приводящие к формированию ПЭ, остаются во многом неясными [13].

Таким образом, механизмы возникновения ПЭ и АМК до конца не изучены, что вызывает сложности в диагностике и невозможность применения таргетной терапии. В связи с этим целями исследования стали изучение факторов ангиогенеза, морфологических особенностей ПЭ и их ассоциированность с АМК.

Материалы и методы

В исследование включены 40 пациенток в возрасте 21–45 лет (средний возраст 35,4±6,4 года). В основную группу вошли 25 пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом «полипы эндометрия» (средний возраст 35,7±5,4 года). Группу контроля составили 15 женщин (средний возраст 35,1±6,8 года) с гистологическим заключением «эндометрий стадии пролиферации» (СтП) без морфологических признаков патологии эндометрия и клинической симптоматики. Критериями исключения служили патологические состояния, которые могли стать причиной АМК, – миоматозные узлы с субмукозным и центрипетальным ростом, аденомиоз II–III степени, а также коагулопатии. У всех пациенток основной группы были проведены ретроспективный анализ течения заболевания и оценка гистологических характеристик ПЭ. В соответствии с классификацией FIGO (2018) все случаи АМК разделены на межменструальные маточные кровотечения (ММК) и обильные менструальные кровотечения (ОМК).

С целью оценки структурных особенностей сосудов проведена морфометрия 25 образцов ПЭ: 13 – манифестирующихся АМК и 12 – не имеющих клинической симптоматики. Морфометрический анализ проводился на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, при 100-кратном увеличении. В каждом образце ПЭ были выбраны два поля зрения сосудистой ножки для измерения следующих параметров: количество со-

судов, толщина сосудистой стенки, диаметр сосудистого просвета. С помощью компьютерной программы Axio Vision 4.0 (Karl Zeiss, Германия) измеряемые показатели были представлены в микрометрах.

Для иммуногистохимического исследования готовили тканевые матрицы следующим способом: отобранные наиболее репрезентативные образцы опухолевой ткани, которые с помощью панчера (игла-пробойник с внутренним зондом) были извлечены из имеющихся блоков (блоков-доноров) в виде парафиновых столбиков и помещены в готовые парафиновые матрицы (набор Tissue-Tek Quick-Ray, Biovitrum, позволяющий изготавливать парафиновые блоки с большим количеством образцов тканей), затем залиты парафином и направлены на микротомию. Готовые гистологические срезы окрашены гематоксилином и эозином, а также подвергнуты иммуногистохимическому исследованию с использованием биомаркеров VEGF-A (клон ab39250, RTU, Abcam, США), CD105 (клон EP274, разведение 1:100, (Epitomics, США) и CD34 (клон QBend10, RTU, Ventana, Швейцария) по стандартной методике на автоматическом иммуногистостейнере Ventana Benchmark Ultra (Roche, Швейцария) в 25 образцах ПЭ, 25 – прилежащего эндометрия и 15 – неизмененного эндометрия стадии пролиферации.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Для определения статистической значимости различий использовался метод Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей 25 (Q1) и 75 перцентиля (Q3). Для оценки корреляций использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмана (R). При $R \leq 0,3$ сила связи определялась как слабая, при R от 0,4 до 0,6 – как умеренная, при $R \geq 0,7$ – как высокая. Статистически значимыми считались различия данных при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия маркеров ангиогенеза в ПЭ, прилежащем и нормальном эндометрии СтП представлена на рисунке 1.

Таким образом, установлено, что в ПЭ уровни экспрессии CD34, CD105 и VEGF-A в 2–4 раза выше, чем в группе контроля ($p < 0,001$). Схожая закономерность обнаружена при сравнении указанных маркеров в ПЭ и прилежащем эндометрии ($p < 0,001$). Уровни CD34 и CD105 оказались низкими как в прилежащем, так и в неизмененном эндометрии, однако экспрессия VEGF-A была вдвое выше в образцах прилежащего эндометрия по сравнению с контрольной группой – $Me=55$ (Q1=50; Q3=60) и $Me=40$ (Q1=37,5; Q3=40), соответственно ($p=0,01$). Следует отметить, что из 25 ПЭ 12 были выявлены на фоне хронического эндометрита (ПЭ + ХЭ), остальные 13 – на фоне неизмененного эндометрия стадии пролиферации (ПЭ + СтП). При сравнении экспрессии CD34 и CD105 между группами ПЭ + ХЭ и ПЭ + СтП существенные различия не выявлены, однако, как оказалось, в ПЭ на фоне ХЭ экспрессия VEGF-A была значимо выше, чем в ПЭ на фоне СтП ($p=0,01$).

Для оценки различий ангиогенеза при АМК и без АМК проведено сравнение экспрессии маркеров в указанных группах (рис. 2). Установлено, что в образцах бессимптомных ПЭ экспрессия VEGF-A была в 1,5 раза ниже, чем в образцах ПЭ, проявлявшихся АМК, – $Me=40$ (Q1=40; Q3=50) и $Me=60$ (Q1=40; Q3=60), соответственно ($p=0,03$). Уровни CD34 и CD105 значимых отличий между группами не имели. Также не была выявлена зависимость между определенным типом АМК (ОМК или ММК) и экспрессией какого-либо из изученных маркеров.

Методом компьютерной морфометрии было проведено сравнение морфологических характеристик сосудистой ножки ПЭ (табл. 1). Согласно полученным данным, количество сосудов в образцах бессимптомных и манифестных ПЭ не имело статистически значимых различий ($p=0,15$). Тем не менее при АМК наблюдались застойные явления в сосудах, что привело к увеличению их диаметра – 71,2 мкм против 60,5 мкм ($p=0,007$). Также обнаружено, что среди ПЭ, проявляющихся АМК, сосудистая стенка была значи-

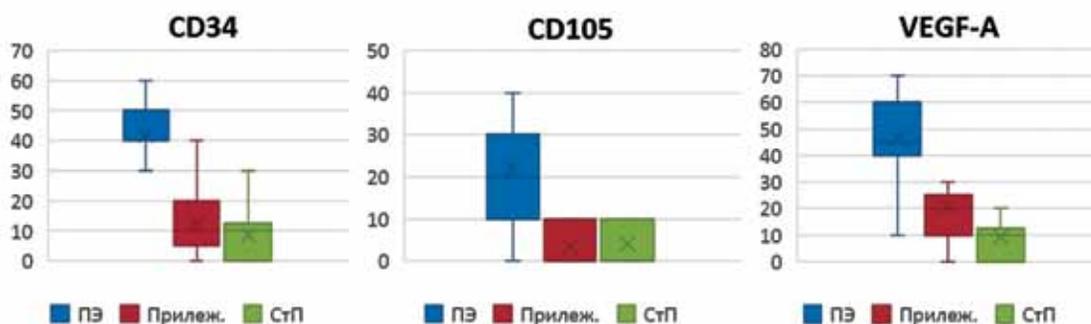


Рис. 1. Экспрессия маркеров ангиогенеза в зависимости от диагноза.

ПЭ – полип эндометрия. Прилеж. – прилежащий эндометрий. СтП – эндометрий стадии пролиферации без патологических изменений

Fig. 1. The relationship between angiogenesis markers expression and clinical diagnosis. ПЭ – endometrial polyp.

Прилеж. – adjacent endometrium. СтП – proliferative endometrium

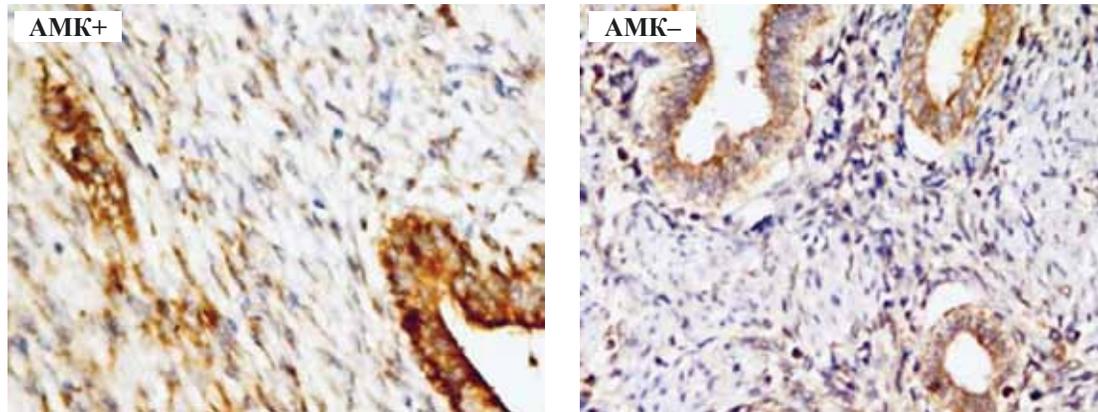


Рис. 2. ИГХ реакция с антителами к VEGF-A в образцах бессимптомных и клинически манифестных полипов эндометрия, $\times 400$
 Fig. 2. Immunohistochemical expression of VEGF-A in symptomatic and asymptomatic endometrial polyps, $\times 400$

Таблица 1 / Table 1

Результаты морфометрического исследования [данные представлены в виде Me (Q1;Q3)]
 The morphometric analysis results [Data are presented in the form Me (Q1; Q3)]

	N	Количество сосудов		Диаметр сосуда		Толщина стенки	
AMK +	13	11,0 (9,0 ;13,0)	p=0,15	71,2 (69,8; 82,6)	p=0,007	16,7 (13,4; 18,3)	p=0,003
AMK –	12	9,0 (9,75 ;11,25)		60,5 (57,6; 66,13)		25,9 (22,2; 27,75)	
OMK	8	12,5 (9,5 ;13,5)	p=0,12	70,9 (68,4; 87,75)	p=0,34	16,1 (14,2; 19,9)	p=0,42
MMK	5	7,0 (7,0; 8,0)		70,2 (56,2; 82,2)		19,9 (18,7; 23,3)	
ПЭ + СтП	13	9,0 (7,0; 12,0)	p=0,21	57,4 (45,7; 60,3)	p=0,007	25,4 (23,2; 26,8)	p=0,04
ПЭ + ХЭ	12	11,5 (9,75; 13,25)		76,5 (70,3; 18,8)		21,4 (16,75; 24,4)	

мо тоньше, чем в группе без AMK, – 16,7 мкм против 25,9 мкм ($p=0,003$). Одновременно с этим статистически значимые различия каких-либо морфологических параметров сосудистой ножки ПЭ при OMK и MMK не выявлены. Морфометрическое исследование показало, что наличие сопутствующего воспалительного процесса было связано с патологическими изменениями структуры сосудов. На фоне ХЭ их диаметр был значимо больше ($p=0,007$), а толщина стенки – меньше ($p=0,04$).

Для изучения возможных причин указанных изменений в сосудах проведен корреляционный анализ результатов морфометрического и ИГХ исследований.

Как видно из рисунка 3, число сосудов в ПЭ имело прямую корреляцию с экспрессией CD34 ($R=0,55$; $p=0,005$) и CD105 ($R=0,53$; $p=0,008$), но не зависело от экспрессии VEGF-A ($R=0,39$; $p=0,06$). В отличие от количества сосудов их диаметр имел слабую связь с уровнями экспрессии CD34 ($R=0,25$; $p=0,25$) и CD105 ($R=0,17$; $p=0,47$). При этом он находился в прямой зависимости от выраженности экспрессии VEGF-A ($R=0,49$; $p=0,01$). Согласно полученным результатам, чем выше была экспрессия VEGF-A, тем меньше толщина стенки сосуда ($R=0,63$; $p<0,001$). С экспрессией CD34 ($R=0,29$; $p=0,29$) и CD105 ($R=0,28$; $p=0,18$) этот

морфометрический показатель также имел обратную зависимость, однако слабую тесноту связи.

Обсуждение

ПЭ занимают ведущее место в структуре внутриматочной патологии, но до настоящего момента многие звенья патогенеза данного заболевания остаются неизученными [1–4]. Поскольку CD34 является показателем микрососудистой плотности, его высокая экспрессия в ПЭ говорит о большем числе сосудов по сравнению с прилежащим и неизменным эндометрием. Учитывая повышение уровня CD105, указывающего на активность пролиферации сосудистого эндотелия, а также VEGF-A, одного из важнейших индукторов ангиогенеза, можно сделать вывод о высокой активности неоангиогенеза в ПЭ. Полученные данные согласуются с гипотезой о вовлеченности патологического ангиогенеза в формирование данного заболевания. В ряде научных работ также показано, что экспрессия VEGF-A и CD105 в ПЭ и прилежащем эндометрии выше, чем в эндометрии здоровых женщин, что может вызывать очаги повышенной васкуляризации и лежать в основе избыточной пролиферации эндометрия [6, 13–15]. В проведенном нами исследовании экспрессия CD34 и CD105 в прилежащем эндометрии не отличалась от

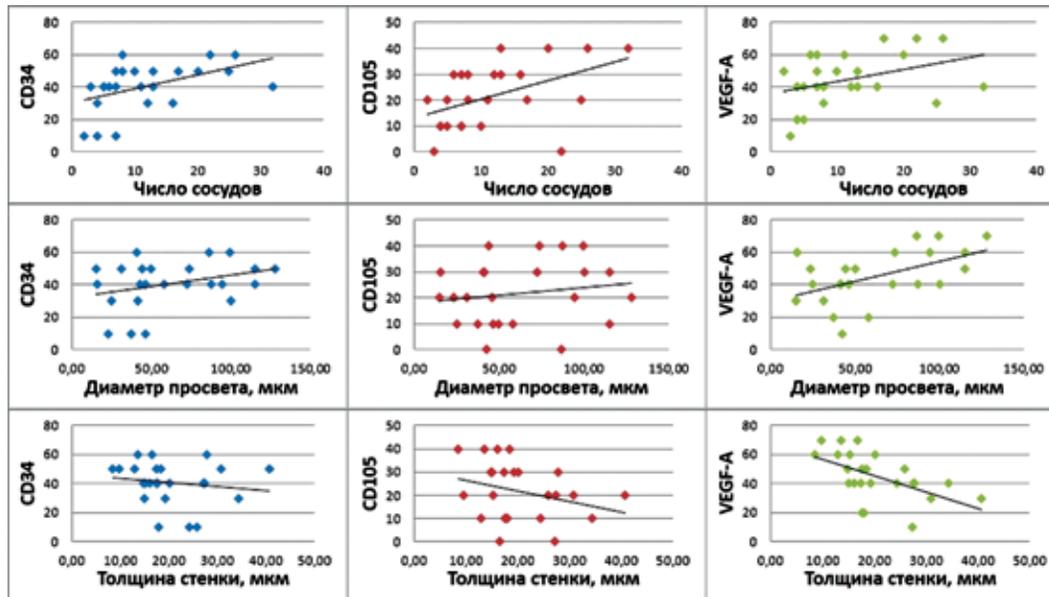


Рис. 3. Зависимость экспрессии маркеров ангиогенеза от морфометрических показателей сосудов полипов эндометрия
 Fig. 3. The correlation between angiogenesis markers and endometrial polyp vessels' morphometric features

таковой в группе контроля, что может говорить об отсутствии активного роста сосудов, однако повышенный уровень VEGF-A свидетельствует об определенных нарушениях ангиогенеза в эндометрии пациенток с ПЭ.

Полученные результаты позволяют предположить, что одной из причин возникновения АМК при ПЭ является аномальная морфология сосудов – увеличение их диаметра и истончение стенки. Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал, что количество сосудов находится в прямой зависимости от экспрессии CD34 и CD105, что представляется закономерным, поскольку CD34 является маркером микрососудистой плотности, увеличивающейся вследствие пролиферации эндотелия сосудов. Согласно полученным данным, уровень VEGF-A находится в прямой зависимости от диаметра сосуда и в обратной от толщины его стенки. Аналогичных исследований, касающихся морфометрических особенностей сосудов ПЭ и их связи с VEGF-A, в доступной литературе нами обнаружено не было, однако в ряде работ изучались нарушения структуры сосудов эндометрия при различных видах АМК. Было отмечено, что при АМК толщина сосудистой стенки ниже, а между эндотелиальными клетками наблюдались «промежутки» [16–18]. Кроме того, при проведении ИГХ исследования обнаружено, что количество сосудов с нарушенной структурой стенок имело прямую зависимость от уровня VEGF-A [16, 19].

В нашем исследовании выявлено, что при АМК экспрессия VEGF-A значимо повышается по сравнению с бессимптомными ПЭ. Таким образом, можно предположить, что высокий уровень VEGF-A является одним из факторов возникновения АМК при ПЭ, поскольку приводит к нарушениям структуры сосудов и повышению вероятности их разрыва. Механизмы индукции VEGF-A в ПЭ остаются до конца не ясными. Одним из

возможных объяснений может служить хроническое воспаление, развивающееся в большинстве ПЭ и прилежащем эндометрии [6, 12]. Согласно данным литературы, патологическая структура сосудов эндометрия наблюдается в 85,7% случаях ХЭ [5]. Ряд исследователей предполагают, что формирование сосудистой ножки ПЭ может быть результатом патологического ангиогенеза, индуцированного ХЭ [5, 6]. Взаимосвязь между VEGF и ХЭ до конца не изучена, однако известно, что многие медиаторы воспаления оказывают проангиогенное действие, в то время как VEGF индуцирует секрецию воспалительных медиаторов, рекрутинг лейкоцитов, вазодилатацию и увеличение сосудистой проницаемости [8, 20]. Важно отметить, что в нашем исследовании в ПЭ на фоне ХЭ наблюдались повышенная экспрессия VEGF-A, а также более выраженное истончение стенок и увеличение диаметра сосудов по сравнению с ПЭ на фоне СтП. Таким образом, можно предположить, что длительный воспалительный процесс играет значимую роль в повышении синтеза VEGF.

Заключение

Выявление высокой экспрессии CD34, CD105 и VEGF-A в полипах эндометрия позволяет сделать заключение о повышенной активности неоангиогенеза, что может являться важным механизмом формирования данного заболевания. Одной из причин возникновения аномальных маточных кровотечений при полипах эндометрия является нарушение морфологии сосудов: увеличение их диаметра и истончение сосудистых стенок. Эти изменения могут быть вызваны избыточным воздействием VEGF-A. Возможная причина усиления ангиогенеза – хронический эндометрит, на фоне которого наблюдаются повышенная экспрессия VEGF-A и усугубление структурных изменений сосудов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.А.И., А.В.А., Г.Е.Ч.
Сбор и обработка материала – И.А.И., А.В.А., М.В.М.
Статистическая обработка данных – И.А.И., Г.Е.Ч., М.В.Д.
Написание текста – И.А.И., А.В.А., Г.Е.Ч.
Редактирование – М.В.М., М.В.Д.

Литература/References

1. Чернуха Г.Е., Асатурова А.В., Иванов И.А., Думановская М.Р. Структура патологии эндометрия в различные возрастные периоды. Акушерство и гинекология. 2018;(8):129–134 [Chernukha G.E., Asaturova A.V., Ivanov I.A., Dumanovskaya M.R. Endometrial lesion's pattern in different age groups. Akusherstvo i ginecologia. 2018;(8):129–134 (In Russ.)]. doi: 10.18565/aig.2018.8.129-134.
2. Capmas P, Pourcelot AG, Giral E, Fedida D, Fernandez H. Office hysteroscopy: A report of 2402 cases. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2016, May 4;45(5):445–50. doi: 10.1016/j.jgyn.2016.02.007.
3. lark TJ, Stevenson H. Endometrial Polyps and Abnormal Uterine Bleeding (AUB-P) – What is the relationship; how are they diagnosed and how are they treated? Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017, Apr 1;40:89–104. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.09.005.
4. Tanos V, Berry KE, Seikkula J, Abi Raad E, Stavroulis A, Sleiman Z et al. The management of polyps in female reproductive organs. International Journal of Surgery. 2017;43:7–16. doi: 10.1016/j.ijso.2017.05.012.
5. Carvalho FM, Aguiar FN, Tomioka R, de Oliveira RM, Frantz N, Ueno J. Functional endometrial polyps in infertile asymptomatic patients: a possible evolution of vascular changes secondary to endometritis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;170(1). doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.012.
6. Xuebing P, TinChiu L, Enlan X, Jing L, Xiaowu H. Is endometrial polyp formation associated with increased expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011, Nov 2;159(1):198–203. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.06.036.
7. Бурлев В.А., Павлович С.В. Ангиогенез и ангиогенные факторы роста в регуляции репродуктивной системы у женщин. Проблемы репродукции. 1999;(5):6–13 [Burlev V.A., Pavlovich S.V. Angiogenesis and Angiogenic factors in regulation of female's reproductive system. Problemy reprodukcii. 1999;(5):6–13 (In Russ.)]. doi: 10.17116/repro20162268-17.
8. Lai T, Vlahos N, Shih I, Zhao Y. Expression Patterns of VEGF and Flk-1 in Human Endometrium during the Menstrual Cycle. J Reprod Infertil. 2015;16(1):3–9.
9. Смирнов И.В., Грызеева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б. Эндоглин (CD105) – мишень визуализации и антиангиогенной терапии злокачественных опухолей. Вопросы онкологии. 2015;61(6):898–907 [Smirnov I.V., Gryzeva I.V., Samoilovich M.P., Klimovich V.B. Endoglin (CD105) – A target for visualization and anti-angiogenic therapy for malignant tumors. Voprosy onkologii. 2015;61(6):898–907 (In Russ.)].
10. Kukreja I, Kapoor P, Deshmukh R, Kulkarni V. VEGF and CD 34: A correlation between tumor angiogenesis and microvessel density-an immunohistochemical study. J Oral Maxillofac Pathol. 2013, Sep;17(3):367–73. doi: 10.4103/0973-029X.125200.
11. Кондриков Н.И., Баринаева И.В. Патология матки: Руководство для врачей. М.: Практическая медицина. 2019. С. 229–233 [Kondrikov N.I., Barinova I.V. Endometrial pathology: Manual for doctors. Moscow: Practicheskaya Medicina. 2019. P. 229–233 (In Russ.)].
12. Donoghue JF, McGavigan CJ, Lederman FL, Cann LM, Fu L, Dimitriadis E et al. Dilated thin-walled blood and lymphatic vessels in human endometrium: a potential role for VEGF-D in progestin-induced break-through bleeding. PLoS ONE. 2012;7(2), e30916. doi: 10.1371/journal.pone.0030916.
13. Indraccolo U, Di Iorio R, Matteo M, Corona G, Greco P, Indraccolo SR. The pathogenesis of endometrial polyps: a systematic semi-quantitative review. European journal of gynecological oncology. 2013, Apr; 34(1):5–22.
14. Мартынова А.Е., Смольникова В.Ю., Демуря Т.А., Коган Е.А. Эффективность программы ЭКО у женщин с миомой матки с учетом маркеров рецептивности эндометрия – пиноподий, LIF, VEGF-A, клаудина-5. Акушерство и гинекология. 2013;(8):40–45 [Martynova A.E., Smolnikova V.Yu., Demurra T.A., Kogan E.A. Efficiency of an IVF program in women with uterine myoma in relation to the endometrial receptivity markers pinopodia, leukemia inhibitory factor, vascular endothelial growth factor-A, claudin-5. Akusherstvo i ginecologia. 2013;(8):40–45 (In Russ.)].
15. Peres GF, Spadoto-Dias D, Bueloni-Dias FN, Leite NJ, Elias LV, Domingues MAC et al. Immunohistochemical expression of hormone receptors, Ki-67, endoglin (CD105), claudins 3 and 4, MMP-2 and –9 in endometrial polyps and endometrial cancer type I. Onco Targets Ther. 2018, Jul 9;11:3949–58. doi: 10.2147/OTT.S160014.
16. Andersson E, Zetterberg E, Vedin I, Hultenby K, Palmblad J, Mints M. Low pericyte coverage of endometrial microvessels in heavy menstrual bleeding correlates with the microvessel expression of VEGF-A. Int J Mol Med. 2015, Feb;35(2):433–8. doi: 10.3892/ijmm.2014.2035.
17. Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. Int J Biochem Cell Biol. 2012, Nov 28;44(11):1800–12. Available from: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.031.
18. Mints M, Hultenby K, Zetterberg E, Blomgren B, Falconer C, Rogers R et al. Wall discontinuities and increased expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in endometrial blood vessels of women with menorrhagia. Fertil Steril. 2007;(88):691–7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.190.
19. Elkilani OA, Soliman MA. Angiogenesis mediators in women with idiopathic heavy menstrual bleeding. Int J Gynaecol Obstet. 2017, Mar;136(3):280–4. doi: 10.1002/ijgo.12068.
20. Shaik-Dasthagirisahab YB, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Potalivo G, Caraffa A et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Mast Cells and Inflammation. Int J Immunopathol Pharmacol. 2013, Apr-Jun;26(2):327–35. doi: 10.1177/039463201302600206.

Информация об авторах/Author information

Илья Андреевич Иванов – аспирант отделения гинекологической эндокринологии НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова.

Ilya A. Ivanov – Postgraduate Student, Department of Gynecological Endocrinology, V.I. Kulakov NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0003-0751-7566>

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

Alexandra V. Asaturova – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Pathology Department, V.I. Kulakov NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0001-8739-5209>

Галина Евгеньевна Чернуха – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения гинекологической эндокринологии НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова.

Galina E. Chernukha – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Gynecological Endocrinology, V.I. Kulakov NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0002-9065-5689>

Мадина Равиловна Думановская – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения гинекологической эндокринологии НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова.

Madina R. Dumanovskaya – Candidate of Medical Sciences, Researcher, Department of Gynecological Endocrinology, V.I. Kulakov NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0001-7286-6047>

Мнихович Максим Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, ведущий научный сотрудник Центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека.

Maxim V. Mnikhovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Senior Researcher, Pathology Department, V.I. Kulakov NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Leading Researcher, Central Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>

© Шамаракова М.В., Асатулова А.В., 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-35-40

УДК: 618.1:616.07 (584.5)

Исследование маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза и натуральных киллеров в пограничных опухолях яичников беременных женщин

М.В. Шамаракова¹, А.В. Асатулова²

¹ ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Актуальность. Изменения во время беременности, необходимые для развития эмбриона, отягощают прогноз злокачественных новообразований. Пограничные опухоли яичников характеризуются отсутствием инвазии, 10-летней выживаемостью у 97% пациенток. Бесспорный интерес вызывает их прогрессирование во время беременности.

Цель исследования. Анализ иммуногистохимической экспрессии маркеров ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода и натуральных киллеров в пограничных овариальных новообразованиях у беременных и не беременных женщин.

Материалы и методы. В исследование были включены гистологические препараты и парафиновые блоки от 13 беременных женщин и 10 не беременных пациенток репродуктивного возраста с пограничными опухолями яичников, поступивших в отделение патогистологии ЦПСИР и патологоанатомическое отделение НЦАГиП в 2012–2017 годы. Образцы пограничных цистаденом яичников были подвергнуты иммуногистохимическому исследованию с использованием биомаркеров VEGF, CD31, CD105, CD56, E-cadherin, Vimentin.

Результаты. Проведенное исследование обнаружило различия лишь в экспрессии CD31, иммунореактивность в отношении остальных маркеров была малоотличной. Среднее число CD31 позитивных сосудов у беременных женщин составило 28 (от 12 до 68), у не беременных пациенток – 11 (от четырех до 19) с достоверной разницей $p < 0,05$.

Выводы. Повышенная экспрессия CD31 в образцах опухолей беременных женщин, вероятно, является физиологической особенностью гестационного периода; схожий уровень экспрессии VEGF, CD-105, E-cadgerin, Vimentin, CD56 в пограничных новообразованиях беременных и не беременных пациенток позволяет предположить отсутствие стимулирующего воздействия беременности на развитие пограничных овариальных новообразований и аналогичный прогноз этого заболевания во время беременности и вне нее.

Ключевые слова: пограничные овариальные опухоли, ангиогенез, беременность, эпителиально-мезенхимальный переход

Для корреспонденции: Марина Викторовна Шамаракова. E-mail: mshamarakova@yandex.ru

Для цитирования: М.В. Шамаракова, А.В. Асатулова. Исследование маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза и натуральных киллеров в пограничных опухолях яичников беременных женщин. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 35-40. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-35-40

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 26.03.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

Evaluation of epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and natural killers markers in borderline ovarian tumors in pregnant women

M.V. Shamarakova¹, A.V. Asaturova²

¹ Center for Family Planning and Reproduction of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Objectives. Physiological changes in the mother's body during pregnancy with the primary aim to support the fetus's growth, may also suspected to worsen the natural course of various malignancies. Though borderline ovarian tumors generally have an excellent prognosis in non-pregnant women, the risk of their progression during gestation remain the subject of interest.

Background. The purpose of this study was to assess the expression of epithelial-mesenchymal markers, angiogenesis and natural killers in samples of ovarian borderline cystadenomas of pregnant and non-pregnant women. **Materials and methods.** Thirteen samples from pregnant women and 10 – non-pregnant patients with diagnosis of ovarian borderline tumors were retrieved from the pathology archives of Center of family planning and reproduction and Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of V.I. Kulakov treated between 2012-2017 years. The immunohistochemical technique was employed using antibodies against VEGF, CD31, CD105, CD56, E-cadherin, Vimentin.

Results. There were no differences in the immunoreactivity of all markers among both groups aside from the expression of CD31. CD31 expression in pregnant women was significantly higher than that in non-pregnant patients ($P < 0.05$) with the median number of CD31 positive vessels 28 (range 12 – 68) and 11 (range 4 – 19), respectively. **Conclusion.** The enhanced CD31 expression in pregnant women appeared to be due to the pregnancy-associated status. We speculate that the same VEGF, CD-105, E-cadherin, Vimentin, CD56 expression levels in borderline ovarian tumors of both pregnant and non-pregnant women's indicates lack of stimulated impact during gestation on borderline ovarian tumors and thereby the behavior of borderline ovarian tumors in pregnancy is similar to that out of gestation.

Key words: borderline ovarian tumors, angiogenesis, pregnancy, epithelial-mesenchymal transition

Corresponding author: Marina V. Shamarakova. E-mail: mshamarakova@yandex.ru

For citation: M.V. Shamarakova, A.V. Asaturova. Evaluation of epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and natural killers markers in borderline ovarian tumors in pregnant women. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 35-40. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-35-40

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26.03.2019. **Accepted** 04.06.2019

Изменения во время беременности, необходимые для развития эмбриона, нередко способствуют росту злокачественных новообразований. Иммунная толерантность, гормоны и факторы роста, обуславливающие пролонгирование беременности, одновременно могут содействовать эпителиально-мезенхимальному переходу злокачественных клеток, увеличению ангио- и лимфоангиогенеза в новообразовании и вследствие этого инвазии и метастазированию опухоли [1–5]. По данным литературы, в основном беременность отягощает течение рака молочной железы, меланомы и цервикальной карциномы, которым свойствен крайне неблагоприятный прогноз вне беременности [6]. Напротив, пограничные опухоли яичников отличаются отсутствием инвазии у большинства пациенток при диагностировании, которое нередко происходит при проведении ультразвукового исследования на раннем сроке беременности для оценки жизнеспособности эмбриона, ограничены яичниками, характеризуются 10-летней выживаемостью у 97% пациенток, даже при выполнении консервативного хирургического лечения, хотя имеются сведения об их рецидивах и злокачественной трансформации [7, 8]. Учитывая сказанное выше, бесспорный интерес вызывает вероятность прогрессирования во время беременности пограничных опухолей яичников.

Цель исследования

Настоящая работа посвящена анализу иммуногистохимической экспрессии маркеров ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода и натуральных киллеров (НК) в пограничных овариальных новообразованиях у беременных и не беременных женщин.

Материалы и методы

Материалом для настоящей работы послужили гистологические препараты и парафиновые блоки 23 пациенток репродуктивного возраста с пограничными опухолями яичников, поступавших в отделение патогистологии ЦПСИР и патологоанатомическое отделение НЦАГиП в 2012–2017 годы. При повторном исследовании гистологических препаратов выбраны наиболее репрезентативные образцы опухолевой ткани, которые с помощью панчера (игла-пробойник с внутренним зондом) были извлечены из имеющихся блоков (блоков – доноров) в виде парафиновых столбиков и помещены в готовые парафиновые матрицы (набор Tissue-Tek Quick-Ray, Biovitrum, позволяющий изготавливать парафиновые блоки с большим количеством образцов тканей), затем залиты парафином и направлены на микротомиию. Готовые гистологические срезы окрашены гематоксилином и эозином и подвергнуты иммуногистохимическому исследованию. Ангиогенез анализировали с помощью антител к фактору роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) – главному сигнальному белку ангиогенеза (VENTANA, США) и эндотелиальным маркерам: CD31 – молекула межклеточной адгезии тромбоцитов и эндотелия типа 1 (клон JC70, VENTANA, США) и CD105 – эндоглину, мембранному гликопротеину, модулирующему ангиогенез (ДАКО, Дания). Исследование эпителиально-мезенхимального перехода проводили с использованием антител к молекуле межклеточной адгезии E-cadherin (клон 36, VENTANA США) и белку промежуточных филаментов Vimentin (в рабочем разведении, VENTANA, AZ, США). Содержание НК определяли с применением их специфиче-

ского маркера CD56 (VENTANA, США). При оценке экспрессии CD31 и CD105 сначала при малом увеличении микроскопа в гистологических срезах были отобраны участки с наибольшим числом микрососудов. В дальнейшем в двух отдельных очагах с повышенной микрососудистой площадью при 200-кратном увеличении микроскопа подсчитывали число всех позитивных микрососудов.

Уровень экспрессии VEGF, E-cadherin и Vimentin оценивали полуколичественным методом в пяти полях зрения при 400-кратном увеличении микроскопа, включающим сопоставление интенсивности окрашивания и числа позитивных клеток. При измерении интенсивности окрашивания неокрашенные клетки соответствовали 0 баллов, клетки со слабо желтым окрашиванием – 1 баллу, клетки с желто-коричневым окрашиванием – 2 баллам, клетки с коричневым окрашиванием – 3 баллам. Число позитивно окрашенных клеток варьировало от 0 баллов сообразных менее 10% всех клеток, 1 балл – 10–49% окрашенных клеток, 2 балла – 50–74% окрашенных клеток, 3 балла – более 75% окрашенных клеток. Результаты обоих подсчетов складывались, значение более 2 баллов считали положительным.

При анализе экспрессии CD56⁺ учитывали позитивные клетки независимо от интенсивности окрашивания в пяти полях зрения при 400-кратном увеличении микроскопа.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты

В исследование были включены препараты от 13 беременных женщин и 10 не беременных пациенток. Средний возраст беременных женщин составил 30,5±4,7 года (от 24 до 40 лет), средний возраст не беременных пациенток – 33,6±5,8 года (от 27 до 42 лет).

Среди беременных женщин девять из 13 во время оперативного вмешательства находились на 12–18-й неделях гестации, остальные четыре – на 40-й неделе беременности. У четырех из девяти женщин, находившихся во II триместре беременности, поражение было двусторонним, причем у одной из них отмечалось распространение на наружную поверхность, что соответствует 1B и 1C2 по FIGO. У остальных пяти новообразование было односторонним, ограниченным яичником, – 1A стадия по FIGO. Гистологическое исследование образцов опухолей у этих пациенток выявило в семи из девяти случаев серозную пограничную цистаденому, при этом у одной женщины с односторонним поражением в препаратах новообразования обнаружен очаг интраэпителиальной карциномы, у одной – двусторонняя эндометриоидная пограничная цистаденома с развитием высококодифференцированной аденокарциномы, у одной – муцинозная пограничная цистаденома с развитием высококодифференцированной карциномы (односторонняя опухоль). У всех четырех

женщин, получивших хирургическое пособие на 40-й неделе гестации, поражение было односторонним, у трех из них соответствовало серозной пограничной цистаденоме, стадия 1A по FIGO, у одной – серозной поверхностной папилломе с участками пограничного строения, расстройством кровообращения с очагами некроза и выраженным отеком, стадия 1C2 по FIGO.

В группе не беременных пациенток у одной женщины зарегистрирована двусторонняя пограничная серозная поверхностная опухоль, соответствующая 1C2 стадии по FIGO, у шести – серозная пограничная цистаденома, у одной из них с развитием высококодифференцированной аденокарциномы, у двух – муцинозная пограничная цистаденома, у одной – эндометриоидная пограничная цистаденома, у всех девяти пациенток установлена 1A стадия по FIGO.

Экспрессия CD31 выявлена в строме опухолей во всех наблюдениях. Среднее число CD31 позитивных сосудов у беременных женщин составило 28 (от 12 до 68), у не беременных пациенток – 11 (от четырех до 19) с достоверной разницей $p < 0,05$ (рис. 1). Хотя в образцах опухолей у женщин, находящихся в III триместре беременности, выявлено большее число CD31 позитивных сосудов по сравнению с препаратами новообразований женщин, находившихся во II триместре беременности, достоверные различия между этими группами не зарегистрированы. У пациенток с развитием аденокарциномы на фоне пограничных опухолей обнаружено 52, 37 и 15 CD31 позитивно окрашенных сосудов, что несколько выше, чем в остальных образцах, однако достоверные различия не обнаружены. Аналогично этому у пациенток с двусторонним поражением визуализировалось большее число CD31 позитивных сосудов, в отличие от женщин с односторонними опухолями, но достоверная разница не выявлена. Следует отметить, что наибольшее число CD31 положительных сосудов, а именно 68, зарегистрировано у пациентки с серозной поверхностной папилломой с участками пограничного строения, расстройством кровообращения с очагами некроза и выраженным отеком, находившейся на доношенном сроке беременности. У не беременной пациентки, имеющей пограничную опухоль с развитием аденокарциномы, также в образцах новообразования отмечено преобладающее число сосудов с экспрессией CD31, без достоверных различий с препаратами пограничной цистаденомы остальных, не беременных женщин.

Положительно окрашенные в отношении CD105 сосуды были обнаружены у двух беременных женщин с пограничной эндометриоидной опухолью с развитием аденокарциномы и пограничной муцинозной цистаденомой с развитием аденокарциномы, их число составило три и два, соответственно. Кроме того, позитивная экспрессия CD105 одного сосуда зарегистрирована в препарате беременной пациентки с пограничной серозной цистаденомой. Среди не беременных женщин в образце серозной цистаденомы с развитием адено-

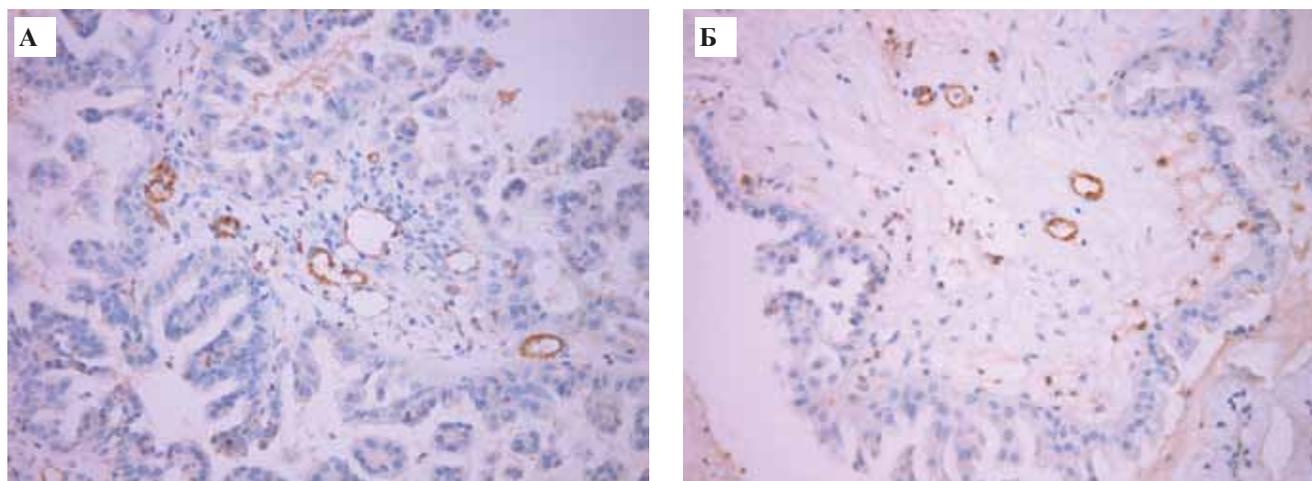


Рис. 1. Экспрессия CD31 в пограничных эпителиальных опухолях яичников у беременных (А) и не беременных (В) женщин, $\times 200$

Fig. 1. CD31 expression in borderline ovarian tumors in pregnant (A) and non-pregnant (B) women, $\times 200$ magnification

карциномы выявлены два положительно окрашенных в отношении CD105 сосуда. Следует отметить, что достоверные различия в экспрессии CD105 между двумя группами не установлены.

Экспрессия VEGF обнаружена во всех образцах, визуализировалась в цитоплазме опухолевых клеток, изредка в клетках стромы и макрофагах, ее среднее значение, оцененное полуколичественным методом, в обеих группах не отличалось и составило 5 баллов (от 4 до 6). Экспрессия VEGF, равная 6 баллам, установлена в трех препаратах пограничных опухолей с развитием аденокарциномы и двух – пограничных цистаденомах, экспрессия VEGF, соответствующая 4 баллам, выявлена в трех образцах муцинозных опухолей, при этом достоверные различия не обнаружены.

Позитивная экспрессия E-cadherin зарегистрирована во всех наблюдениях, установлено мембранное и цитоплазматическое окрашивание, одинаковое в обеих группах, составившее 5–7 баллов, лишь у женщины, находившейся во II триместре беременности, с серозной пограничной цистаденомой и развитием интраэпителиальной карциномы зарегистрирована экспрессия E-cadherin 4 балла, обусловленная утратой окрашивания данного маркера в очаге развития интраэпителиальной карциномы.

Анализ экспрессии Vimentin также не выявил различия в опухолях беременных и не беременных женщины, мембранное окрашивание эпителиального компонента пограничных цистаденом яичников оценено преимущественно в 2–4 балла, отсутствие эпителиальной экспрессии Vimentin обнаружено у пациентки с серозной поверхностной папилломой с участками пограничного строения, находившейся на 40-й неделе гестации.

Позитивная экспрессия CD56 была выявлена в четырех образцах опухолей беременных женщин и четырех не беременных пациенток. У трех беременных женщин в препаратах пограничных новообразований яичников

обнаружено по одной НК-клетке, у одной – две НК. Аналогичное распределение зарегистрировано в образцах пограничных цистаденом не беременных пациенток: у трех – по одной позитивной в отношении CD56 клетке, у одной пациентки – две. Достоверные различия в экспрессии CD56 между обеими группами не выявлены.

Обсуждение

Прогрессирование злокачественных новообразований во время беременности подтверждается различными научными работами. Так, Song et al. обнаружили способность плацентарного ростового фактора (placental growth factor, PIGF) стимулировать экспрессию матриксной протеиназы MMP7 и транскрипционного фактора ZEB2, приводящую к деградации экстрацеллюлярного матрикса и эпителиально-мезенхимальному переходу клеток рака яичников [5]. Huang et al. описали аналогичное воздействие PIGF на клетки цервикальной карциномы [4]. Balassa et al. показали, что индуцированный прогестероном блокирующий фактор (progesterone-induced blocking factor, PIBF), обеспечивающий пролонгирование беременности, также может оказывать стимулирующее воздействие на эпителиально-мезенхимальный переход [2]. Последний представляет комплексный обратимый процесс изменения морфологических особенностей, свойственных эпителиальным клеткам, на мезенхимальный фенотип, позволяющий злокачественной опухоли осуществлять инвазивный рост и метастазирование. Критерием эпителиально-мезенхимального перехода принято считать иммунореактивность E-cadherin и Vimentin [9]. Полученные в настоящей работе результаты экспрессии E-cadherin и Vimentin в пограничных опухолях яичников соответствуют данным Wu et al., изучавших иммуногистохимическое окрашивание этих маркеров в разных овариальных

новообразованиях и обнаруживших в пограничных цистаденомах снижение мембранной и увеличение цитоплазматической экспрессии E-cadherin, повышение экспрессии Vimentin [10]. Однако наибольшего внимания заслуживает отсутствие разницы в экспрессии этих маркеров в образцах опухолей беременных и не беременных женщин.

Экспрессия VEGF также не отличалась в препаратах цистаденом обеих групп, противоположно сведениям Gao et al., которые на модели мышей доказали стимулирующее действие хорионического гонадотропина на экспрессию VEGF и, соответственно, сосудобразование в овариальном раке [11].

Низкий уровень экспрессии CD105, зарегистрированной в настоящем исследовании в образцах пограничных опухолей беременных и не беременных женщин, вероятно, относится к благоприятным признакам, поскольку, являясь проангиогенным ростовым фактором, значительное повышение его экспрессии отмечается в пролиферирующих эндотелиальных клетках, как правило, составляющих злокачественное новообразование, в отличие от неизмененного эндотелия и зрелых сосудов [12].

Общеизвестно, что НК имеют важное значение в противоопухолевом иммунитете, их повышенная концентрация в опухоли ассоциирована с более благоприятным прогнозом [13]. Вместе с тем существует гипотеза, что, локализуясь на границе опухоли и стромы, НК снижают восприимчивость опухолевых клеток к иммунному ответу, то есть индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход [14]. Доказано, что прогестерон оказывает подавляющее воздействие на функционирование НК, при этом для достижения данного эффекта во время гестационного периода достаточной является концентрация прогестерона в 100 раз ниже по сравнению с таковой у не беременных женщин [15]. В связи с этим значение единичных НК, выявленных в препаратах пограничных опухолей, представляется неясным, но свидетельствует об идентичности иммунного ответа на новообразования как у беременных, так и не беременных женщин.

Таким образом, схожие результаты экспрессии VEGF, CD105, E-cadherin, Vimentin, CD56 в новообразованиях беременных и не беременных женщин, установленные в настоящей работе, по-видимому, свидетельствуют о невосприимчивости пограничными цистаденомами стимулирующего влияния гормонов и факторов роста, повышенная концентрация которых ассоциирована с гестационным периодом. Подтверждением этого могут служить сведения Wang et al., исследовавших воздействие гонадотропинов на ангиогенез в неизменной овариальной ткани, доброкачественных, пограничных и злокачественных новообразованиях яичников и обнаруживших, что лютеинизирующий гормон содействует экспрессии VEGF в овариальных карциномах и не оказывает подобного эффекта в пограничных опухолях [16].

Выявленные достоверные различия в экспрессии CD31 в препаратах беременных и не беременных пациенток коррелируют с данными других авторов. Khosrotehrani et al., изучавшие влияние гестации на течение меланомы *in vivo*, зарегистрировали значительно превышающее число CD31 позитивных сосудов в меланоме беременных мышей по сравнению с аналогичными образцами у не беременных. Данные результаты были ассоциированы с повышенным объемом и массой меланомы, преобладающим числом очагов метастатического поражения и снижением продолжительности жизни у беременных мышей [17]. Genin et al., сопоставившие ангиогенез, лимфоангиогенез и гистологические особенности карциномы молочной железы у беременных и не беременных женщин, установили в образцах опухоли беременных пациенток увеличенное число кровеносных сосудов. Поскольку достоверные различия ни в стадии заболевания, ни в гистологическом типе опухоли, ни в экспрессии рецепторов гормонов между изучаемыми группами не были установлены, а кроме того, большее число кровеносных сосудов обнаружено и в не пораженной карциномой ткани молочной железы у беременных женщин, которое не отличалось от микрососудистой плотности в образцах карциномы, авторы предположили, что увеличение микрососудистой плотности связано с беременностью [3]. В подтверждение этому Lusi et al. отметили в менингиомах, ассоциированных с гестацией, повышенную васкуляризацию и отек, приводящие к увеличению объема опухоли, который может уменьшиться после родоразрешения и возрасти снова во время следующей беременности [18]. Таким образом, изменения в организме женщины во время беременности способствуют повышению микрососудистой плотности в новообразованиях.

Заключение

Пограничные опухоли яичников у беременных женщин характеризуются повышением микрососудистой плотности, представленной высокой экспрессией CD31 и, вероятно, являющейся физиологической особенностью гестационного периода. Вместе с тем схожий уровень экспрессии VEGF, CD-105, E-cadherin, Vimentin, CD56 в пограничных новообразованиях беременных и не беременных пациенток позволяет предположить отсутствие стимулирующего воздействия беременности на развитие пограничных овариальных новообразований и вследствие этого аналогичный прогноз данного заболевания во время беременности и вне нее.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – М.В.Ш.
Сбор и обработка материала – М.В.Ш., А.В.А.
Статистическая обработка данных – М.В.Ш.
Написание текста – М.В.Ш.
Редактирование – А.В.А.

Литература/References

1. *Shah NM, Herasimtschuk AA, Boasso A, Benlahrech A, Fuchs D, Imami N et al.* Changes in T cell and Dendritic cell Phenotype from Mid to late Pregnancy are indicative of a shift from immune Tolerance to immune activation. *Frontiers in Immunology*. 2017; 15(8):1138. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01138>.
2. *Balassa T, Berta G, Jakab L, Bohonyi N, Szekeres-Bartho J.* The effect of the Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018;125:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.047>.
3. *Genin AS, Antoine M, Aractingi S, Roizier R.* Pregnancy Stimulates Tumor Angiogenesis in Breast Carcinoma. *Anticancer Research*. 2014;34:125–32.
4. *Huang W, Zhu S, Liu Q, Li C, Li L.* Placenta growth factor promotes migration through regulating epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in cervical cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014; 7(12):8506–19.
5. *Song N, Liu H, Ma X, Zhang S.* Placental Growth Factor Promotes Ovarian Cancer Cell Invasion via ZEB2. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;38:351–8. <https://doi.org/10.11559/0/000434836836535>.
6. *Stensheim H, Miller B, van Dijk T, Fossa SD.* Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: A registry-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(1):45–51. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.4110>.
7. *Hoover K, Jenkins TR.* Evaluation and management of adnexal mass in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011;205:97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.01.050>.
8. *Silverberg SG, Bell DA, Kurman RJ, Seidman JD, Prat J, Ronnett BM et al.* Borderline ovarian tumors: key points and work- shop summary. *Human Pathology*. 2004;35(8):910–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.03.003>.
9. *Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK.* Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*. 2016;15:18. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0502-x>.
10. *Wu D, Liu L, Ren C, Kong D, Zhang P, Jin X et al.* Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncology Letters*. 2016;11:1463–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4092>.
11. *Gao S, Fan C, Huang H, Zhu C, Su M, Zhang Y.* Effects of HCG on human epithelial ovarian cancer vasculogenic mimicry formation in vivo. *Oncology Letters*. 2016;12:459–66. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4630>.
12. *Liu C, Yan F, Xu Y, Zheng H, Sun L.* InVivo Molecular Ultrasound Assessment of Glioblastoma Neovasculature with Endoglin-Targeted Microbubbles. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2018;8425495. <https://doi.org/10.1155/2018/8425495>.
13. *Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L.* Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European Journal of Immunology*. 2014;44(6):1582–92. <https://doi.org/10.1002/eji.201344272>.
14. *Cantoni C, Huergo-Zapico L, Parodi M, Pedrazzi M, Mingari MC, Moretta A et al.* NK Cells, Tumor Cell Transition, and Tumor Progression in Solid Malignancies: New Hints for NK-Based Immunotherapy? *Journal of Immunology Research*. 2016, Article ID 4684268, 13 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4684268>.
15. *Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pacsa AS.* The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *Journal of Reproductive Immunology*. 1985;7(2):121–8. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(85\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0165-0378(85)90066-X).
16. *Wang J, Luo F, Lu JJ, Chen PK, Liu P, Zheng W.* VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *International Journal of Cancer*. 2002;97:163–7. <https://doi.org/10.1002/ijc.1593>.
17. *Khosrotehrani K, Huu SN, Prignon A, Avril MF, Boitier F, Oster M et al.* Pregnancy Promotes Melanoma Metastasis through Enhanced Lymphangiogenesis. *The American Journal of Pathology*. 2011;178:1870–80. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.044>.
18. *Lusis EA, Scheithauer BW, Yachnis AT, Fischer BR, Chicoine MR, Paulus W et al.* Meningiomas in pregnancy: a clinicopathologic study of 17 cases. *Neurosurgery*. 2012;71:951–61. <https://doi.org/10.1227/neu.0b013e31826ad6f6>.

Информация об авторах / Author information

Марина Викторовна Шамаракова – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом отделения патогистологии ЦПСИР.
 Marina V. Shamarakova – Candidate of Medical Sciences, a doctor-pathologist of the Histopathology Department of the CFPR.
<https://orcid.org/0000-0002-0972-4350>

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

Alexandra V. Asaturova – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the pathoanatomical department of NMRC for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after acad. V.I. Kulakov.
<https://orcid.org/0000-0001-8739-5209>

Состояние митохондрий в клетках Пуркинье мозжечка крысы при холестазе

С.В. Емельянчик¹, О.А. Карнюшко², С.М. Зиматкин²

¹ УО «Гродненский государственный университет имени Я. Купалы», Гродно, Беларусь

² УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Цель исследования – комплексом методов (гистохимия, электронная микроскопия, иммуногистохимия) оценить состояние энергетического аппарата клеток Пуркинье мозжечка крыс при экспериментальном холестазе.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 108 белых крысах-самцах массой 200–250 граммов. В контрольной группе проводили ложную операцию (сохранялся физиологический отток желчи в 12-перстную кишку), в экспериментальной перевязывали общий желчный проток с последующей перерезкой между двумя лигатурами. Кору мозжечка исследовали на 2-, 5-, 10-, 20-, 45- и 90-е сутки эксперимента. Клетки Пуркинье мозжечка изучали гистологически, гистохимически, электронномикроскопически и иммуногистохимически.

Результаты. Установлено, что после перевязки общего желчного протока в клетках Пуркинье мозжечка активность маркерных ферментов митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и дегидрогеназы восстановленного НАД (НАДН-ДГ) снижается умеренно на 5-е сутки, максимальное снижение отмечается на 10-е сутки. В клетках Пуркинье мозжечка на 10-е сутки опыта определены митохондрии с разрушенными кристами, просветленным матриксом, появляются гигантские формы. При этом иммунореактивность АТФ-синтазы увеличивается на 2-е сутки, затем происходит уменьшение на 5-е сутки с максимумом на 10-е сутки и на 20-е сутки – умеренное уменьшение. На 45-е и 90-е сутки у выживших животных отмечается постепенная нормализация всех изученных параметров.

Заключение. После перевязки общего желчного протока в клетках Пуркинье мозжечка у крыс происходит значительное нарушение энергетических процессов.

Ключевые слова: СДГ, НАДН-ДГ, митохондрии, АТФ-синтаза, мозжечок, холестаз, крысы

Для корреспонденции: Ольга Анатольевна Карнюшко. E-mail: karnyushko-olga@mail.ru

Для цитирования: С.В. Емельянчик, О.А. Карнюшко, С.М. Зиматкин. Состояние митохондрий в клетках Пуркинье мозжечка крысы при холестазе. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 41-47. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-41-47

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 18.03.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

The state of mitochondria in cerebellum Purkinje cells of rats with cholestasis

S.V. Emelyanchik¹, O.A. Karnyushko², S.M. Zimatkin²

¹ Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

² Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Objective – complex methods (histochemistry, electron microscopy, immunohistochemistry) to study the state of the energy apparatus in cerebellum Purkinje cells of rat with experimental cholestasis.

Materials and methods. The research was performed on 108 white male rats weighing 200–250 g. In experimental animals the common bile duct ligation (the physiological outflow of bile into the duodenum was stopped), in control – false surgery. The cerebellum samples were examined at 2, 5, 10, 20, 45, and 90 days after operation. The cerebellum Purkinje cells were investigated histochemically, electron microscopically and immunohistochemically.

Results. It was established that after ligation of the common bile duct in cerebellum Purkinje cells the activity of the markers enzymes of mitochondria, succinate dehydrogenase (SDH) and dehydrogenase of reduced NAD (NADH-DG), decreases moderately on the fifth day, the maximum decrease – on the 10th day. On the 10th day of the experiment, mitochondria with destroyed crosses, enlightened matrix, appear in the cerebellum Purkinje cells. At the same time, the immunoreactivity of ATP synthase increases on the second day, then a decrease on

the fifth day, with a maximum on the 10th day and on the 20th day a moderate decrease. In survived animals at the 45 – 90 days after operation all parameters studied were recovered.

Conclusions. Thus, after ligation of the common bile duct in rats, in cerebellum Purkinje cells took place a disturbances of energy processes.

Key words: SDH, NADH-DG, mitochondria, ATP synthase, cerebellum, cholestasis, rats

Corresponding author: Olga A. Karnyushko. E-mail: karnyushko-olga@mail.ru

For citation: S.V. Emelyanchik, O.A. Karnyushko, S.M. Zimatkin. The state of mitochondria in cerebellum Purkinje cells of rats with cholestasis. Clin. exp. morphology. (In Russ.). 2019; 8(2): 41-7. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-41-47

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 18.03.2019. **Accepted** 04.06.2019

Холестаз (застой желчи, нарушение ее оттока из печени в 12-перстную кишку) является частым осложнением болезней печени и желчевыводящих путей. В наших предыдущих экспериментальных исследованиях показано, что холестаз приводит к печеночной энцефалопатии, значительным гистологическим, гистохимическим и ультраструктурным нарушениям в нейронах коры мозга и мозжечка, гибели некоторых из них [1–4]. При этом наиболее уязвимыми для повреждения от холестаза оказались клетки Пуркинье мозжечка. Известно, что нейроны являются сильно энергозависимыми клетками, поэтому для поддержания высокого уровня функционирования и гомеостаза необходимо нормальное состояние их митохондрий. Дисфункция митохондрий лежит в основе многих неврологических и нейродегенеративных заболеваний [5–8]. При холестазе увеличивается содержание билирубина и холестерина в крови, что и может приводить к митохондриальной дисфункции в нейронах мозга. Маркерным ферментом митохондрий является сукцинатдегидрогеназа – ферментный комплекс, построенный из четырех субъединиц белка (SDHA, SDHB, SDHC и SDHD), гены которых расположены в ядерной ДНК клетки. Этот фермент выступает как компонент цикла трикарбоновой кислоты, окисляя сукцинат до фумарата и убихинон до убихинола в транспортной цепи митохондрий. Другой маркерный фермент митохондрий – дегидрогеназа восстановленного НАД (НАДН-ДГ), участвующая в транспорте электронов. Одним из чувствительных иммуногистохимических маркеров деятельности митохондрий является белок АТФ-синтаза – комплекса V, образующего АТФ из АДФ и расположенного на кристах внутренней мембраны митохондрий. В связи с изложенным выше представляло интерес комплексное гистохимическое, иммуногистохимическое и электронномикроскопическое исследование митохондрий в клетках Пуркинье мозжечка при экспериментальном холестазе.

Цель исследования – комплексом методов (гистохимия, иммуногистохимия, электронная микроскопия) оценить состояние митохондрий в клетках Пуркинье мозжечка при экспериментальном холестазе у крыс.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 108 беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 граммов. На проведение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.01.2017). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Крысам опытной группы под ингаляционным эфирным наркозом проводили перевязку общего желчного протока (ОЖП) на 3–5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними [1]. Крысам контрольной группы проводили лапаротомию без перевязки ОЖП. Спустя 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы (для синхронизации по времени) животных выводили из эксперимента декапитацией. Участки коры мозжечка животных экспериментальной и контрольной групп обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях для получения сопоставимых результатов.

Для гистохимического исследования кусочки мозжечка замораживали и хранили в жидком азоте, кусочки мозжечка опытных и контрольных животных монтировали одним блоком, криостатные срезы обрабатывали для выявления оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса, – сукцинатдегидрогеназы (СДГ; сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1) по M. Nachlas et al., и с транспортом электронов – дегидрогеназы восстановленного НАД (НАДН-ДГ; НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3) по M. Nachlas, D. Walker, A. Seligman [9]. Затем заключали в глицерин-желатину.

Для иммуногистохимического исследования кусочки мозжечка фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C в течение 20 часов, а затем заключали в парафин. Стандартные парафиновые срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (Leica RM 2125 RTS, Германия). Срезы мозжечка опытных и контрольных животных одного срока монтировали на предметные стекла единым блоком. Для иммуногистохимического выявления АТФ-синтазы применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:2400 (выбрано как оптимальное из ряда разведений 1:200–1:3000

в предварительном исследовании) при +4°C, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436). Негативным контролем служили срезы, при обработке которых не использовали первичные антитела.

Визуальное исследование, микрофотографирование и морфометрию гистохимических и иммуногистохимических препаратов проводили при помощи микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC320 (Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Для электронномикроскопического исследования материал от животных опытной и контрольной групп фиксировали в течение 2 часов при +4°C в двух порциях 1% раствора четырехоксида осмия (OsO_4) на 0,1M буфере Миллонига (pH 7,4). Затем промывали в растворе буфера Миллонига (20 мл) + сахарозы (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50% и 70%), смеси спирта и ацетона, ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заливали в эту смесь. Срезы готовили с помощью ультратома MT-7000 (США). Изучение и микрофотографирование препаратов проводили при помощи электронного микроскопа JEM 100СХ II (JEOL, Япония) в Центре электронной микроскопии Института физиологии НАН Беларуси. Морфометрию митохондрий проводили по методу Морозова [10].

Полученные результаты обрабатывали методом непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897).

В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования

Гистохимия. Активность маркерных ферментов митохондрий СДГ и НАДН-ДГ в клетках Пуркинье мозжечка выявляется по темно-синему осадку продукта гистохимической реакции диформаза (рис. 1, 2). Через 2 суток холестаза активность изученных ферментов не меняется, после 5 суток происходит снижение активности в клетках Пуркинье: СДГ – на 2,4% и НАДН-ДГ – на 8,3%. На 10-е сутки холестаза отмечено дальнейшее снижение активности СДГ на 24% и НАДН-ДГ на 17% по сравнению с контролем (рис. 1, 2). Через 20 суток активность ферментов оставалась значительно сниженной: для СДГ – на 24% и для НАДН-ДГ – на 11%. Спустя 45 суток активность СДГ в клетках Пуркинье повышалась на 6%, НАДН-ДГ не отличалась от контроля, а через 90 суток происходила нормализация активности обоих ферментов (табл. 1).

Имуногистохимия. В клетках Пуркинье мозжечка иммунореактивность АТФ-синтазы выявляется в виде мелких и средних размеров гранул темно-коричневого цвета, относительно гомогенно расположенных в цитоплазме. При этом ядра клеток Пуркинье иммунонегативны (рис. 3). После двух суток холестаза происходит временное увеличение иммунореактивности АТФ-синтазы в клетках Пуркинье на 4%, после пяти

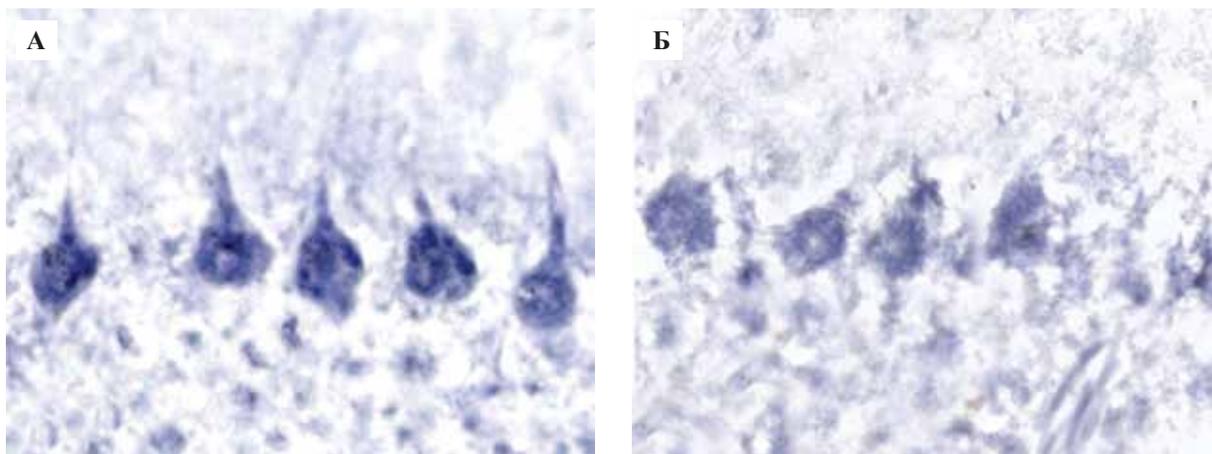


Рис. 1. Активность СДГ в клетках Пуркинье мозжечка крыс.

А – контроль (10 суток после ложной операции), уменьшение в опыте, Б – 10 суток холестаза. Окраска по методу Нахласа и соавт., $\times 300$

Fig. 1. SDH activity in Purkinje cells of the rat cerebellum.

А – control group (10 days after false surgery), B – decrease during experience (10 days of cholestasis). Stain by Nahlas et al. method, $\times 300$

Активность СДГ и НАДН-ДГ в перикарионах клеток Пуркинье мозжечка крыс в различные сроки после перевязки общего желчного протока (ед.×10³) (Me±IQR)
The activity of SDH and NADH-DG in the Purkinje cell perikaryon in rat cerebellum at various times after common bile duct ligation (units × 10³) (Me ± IQR)

Сутки	Группа	СДГ	НАДН-ДГ
2-е	контроль	457,58±36,09	611,65±30,05
	опыт	438,53±58,73	581,12±78,47
5-е	контроль	442,83±21,13	600,20±29,25
	опыт	432,20±71,11 * ↓	550,47±27,31 * ↓
10-е	контроль	457,32±27,71	587,04±36,67
	опыт	345,17±94,65 ** ↓	484,50±011,15 ** ↓
20-е	контроль	450,20±9,61	656,53±26,55
	опыт	342,92±69,27 ** ↓	583,74±29,92 ** ↓
45-е	контроль	454,76±38,93	601,16±34,96
	опыт	480,54±13,15 * ↑	578,87±74,40
90-е	контроль	448,66±34,42	604,56±15,93
	опыт	469,51±10,09	612,56±32,70

* – p<0,05; ** – p<0,01 по сравнению с контролем: стрелками показаны направления изменений

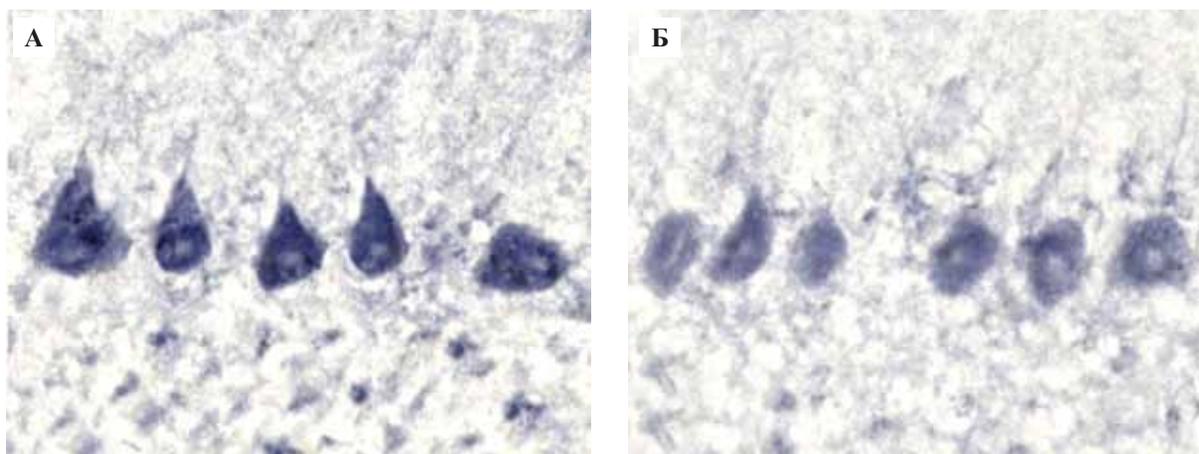


Рис. 2. Активность НАДН-ДГ в клетках Пуркинье мозжечка крыс.

А – контроль (10 суток после ложной операции), уменьшение ее в опыте, Б – 10 суток холестаза. Окраска по Нахласу, Уокеру, Зелигману, ×300

Fig. 2. NADH-DG activity in Purkinje cells of the rat cerebellum.

А – control (10 days after false surgery), B – decrease during experience (10 days of cholestasis). Stain by Nahlas, Walker, Zeligman, ×300

суток холестаза – снижение на 17%, а после 10 суток – на 27% (рис. 3, 4). После 20 суток холестаза сохраняется достоверное снижение иммунореактивности на 9,6%. Спустя 45 и 90 суток после перевязки/перерезки общего желчного протока иммунореактивность АТФ-синтазы в клетках Пуркинье нормализуется (рис. 4).

Электронная микроскопия. Спустя 10 суток холестаза практически во всех клетках Пуркинье наблю-

даются деструктивные (дегенеративные) изменения: от умеренных до тяжелых – сморщивание нейронов и появление клеток-теней. Матрикс многих митохондрий набухший (с просветлением), кристы и наружная мембрана частично или полностью разрушены. Иногда митохондрии имеют контакты с ядерной оболочкой клетки. Количество органелл на единицу площади цитоплазмы клеток Пуркинье и площадь митохондрий

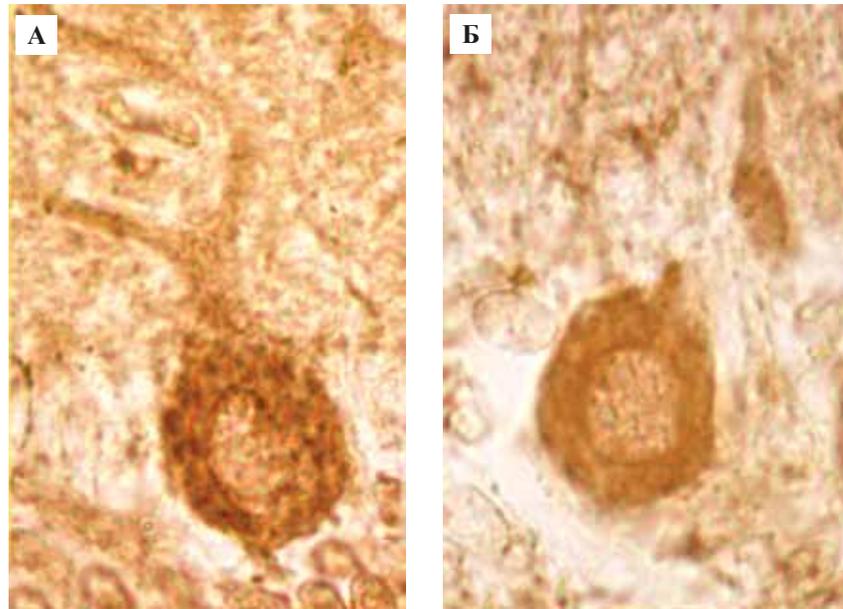


Рис. 3. Иммунореактивность АТФ-синтазы в клетках Пуркинью мозжечка крысы. А – контроль (10 суток после ложной операции) и уменьшение ее в опыте, Б – (10 суток холестаза). Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу, $\times 800$
 Fig. 3. ATP synthase immunoreactivity in Purkinje cells of the rat cerebellum.
 А – in the control group (10 days after false surgery), В – decrease in the experiment (10 days of cholestasis). ATP synthase immunohistochemical reaction, $\times 800$

уменьшаются – на 32% и 44%, соответственно. Степень набухания увеличивается на 29%, коэффициент фрагментации крист – на 31% (рис. 5, табл. 2).

Обсуждение

Снижение активности маркерных ферментов митохондрий – СДГ и НАДН-ДГ – в перикарионах клеток Пуркинью мозжечка после перевязки/перерезки ОЖП

с 5-х суток (с максимумом на 10-е сутки) свидетельствует об угнетении функциональной активности митохондрий. Временное повышение иммунореактивности АТФ-синтазы в клетках Пуркинью мозжечка на 2-е сутки холестаза можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на адаптацию нейронов к холестаза. Но затем на 5-е, 10-е, 20-е сутки она значительно снижается, что отражает срыв адаптации и нарушение

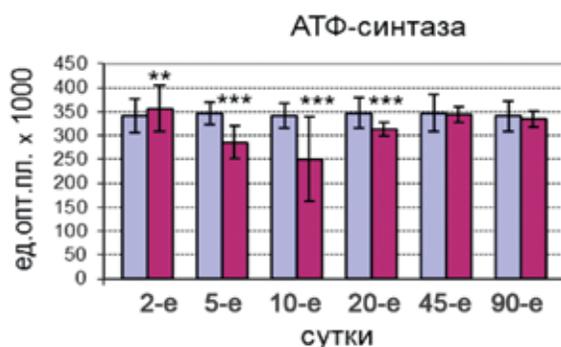


Рис. 4. Иммунореактивность АТФ-синтазы в клетках Пуркинью мозжечка контрольных крыс и в разные сроки после перевязки общего желчного протока (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)
 *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Fig. 4. ATP synthase immunoreactivity in Purkinje cells of the rat cerebellum in control group and at various times after the common bile duct ligation (units $\times 10^3$) (Me \pm IQR)
 *** – $p < 0,001$ compared to the control; ** – $p < 0,01$ compared to the control

Таблица 2 / Table 2

Показатели ультрамикроскопической морфометрии митохондрий клеток Пуркинью коры мозжечка крыс после десяти суток холестаза (Me \pm IQR)
 Ultramicroscopic morphometry indicators of Purkinje cell mitochondria in the cerebellar cortex in rat after 10 days of cholestasis (Me \pm IQR)

Показатель	Контроль (n=5)	Опыт (n=5)
Число митохондрий, в 1 мкм ²	0,072 \pm 0,014	0,049 \pm 0,007 * ↓
Площадь митохондрии, мкм ²	5,73 \pm 0,590	3,226 \pm 0,492 ** ↓
Степень набухания, усл. ед.	1,083 \pm 0,038	1,40 \pm 0,20 ** ↑
Коэффициент фрагментации крист, усл. ед.	0,712 \pm 0,117	0,938 \pm 0,125 * ↑

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем; стрелками показано направление изменений

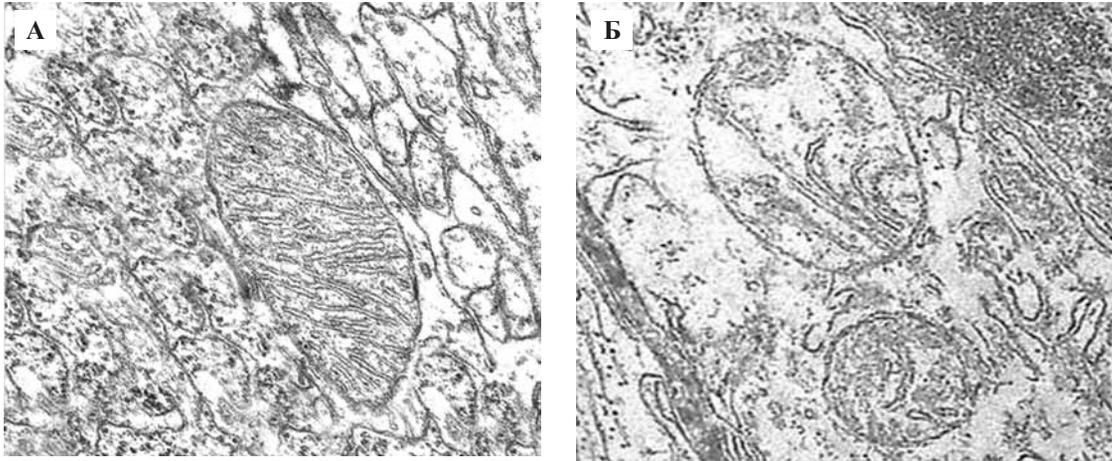


Рис. 5. Митохондрии клеток Пуркинью мозжечка.

А – контроль (10 суток после ложной операции), Б – холестаз 10 суток; митохондрии набухшие, кристы разрушены. Электронная микрофотография, $\times 10\,000$

Fig. 5. Mitochondria of Purkinje cerebellum cells.

A – control (10 days after false surgery), B – 10 days of cholestasis; mitochondria are swollen, cristae are destroyed. Electron micrograph, $\times 10\,000$

энергетических процессов в клетке, приводящих к гибели части нейронов [2, 4]. Возможно, это обусловлено нарастанием содержания в крови и в мозге нейротоксических веществ (билирубина) и как следствие нарушением биологических [11], в частности митохондриальных, мембран [6]. Это подтверждается и нашими электронно-микроскопическими данными о нарушении целостности митохондрий, их набухании с просветлением матрикса, разрушении крист и мембран оболочки митохондрий в цитоплазме клеток Пуркинью спустя 10 суток холестаза. Иногда встречаются гигантские митохондрии, что считают приспособительным явлением с целью восстановления энергетических возможностей клетки при массовом разрушении митохондрий [12].

Выявленные нарушения митохондрий коррелируют с деструктивными процессами в нервных клетках, включая клетки Пуркинью мозжечка, описанными нами ранее [2–4]. Они появляются на 2-е сутки и достигают максимума на 10–20-е сутки опыта. В отдаленные сроки (45 и 90 суток) у выживших животных происходит нормализация структурных и метаболических показателей нейронов, возможно, обусловленная восстановлением оттока желчи в результате прорастания обходных желчевыводящих путей и устранения холестаза [1].

Нейроны энергозависимы, поэтому выявленные нарушения митохондрий могут приводить к неврологическим и нейродегенеративным нарушениям в мозге и гибели нейронов [5]. Возможно, что описанные в клинике у пациентов с холестатическими состояниями двигательные расстройства связаны с нарушениями именно клеток Пуркинью мозжечка [13].

Заключение

1. После перевязки/перерезки общего желчного протока у крыс активность маркерных ферментов

митохондрий СДГ и НАДН-ДГ в клетках Пуркинью мозжечка снижается на 5-е и особенно на 10-е сутки, а затем, на 20–90-е сутки, постепенно нормализуется.

2. Иммунореактивность белка АТФ-синтазы в клетках Пуркинью мозжечка крыс несколько увеличивается на 2-е сутки холестаза, затем на 5–20-е сутки происходит ее уменьшение (с минимумом на 10-е сутки), а на 45–90-е сутки она постепенно нормализуется.

3. Через 10 суток холестаза электронномикроскопически в клетках Пуркинью мозжечка уменьшаются число и размеры митохондрий, происходят просветление матрикса, разрушение и фрагментация их крист.

4. В совокупности полученные данные указывают на нарушения энергетического аппарата клеток Пуркинью мозжечка при холестазе у крыс.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – С.М.З., С.В.Е.

Сбор и обработка материала – О.А.К., С.В.Е.

Статистическая обработка данных – С.В.Е.

Написание текста – С.М.З.

Редактирование – С.М.З., О.А.К.

Литература/References

1. Емельяничук С.В., Зиматкин С.М. К моделированию подпеченочного холестаза у крыс. *Новости медико-биологических наук.* 2018;17(2):56–61 [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. To modeling of subhepatic cholestasis in rats. *Novosti med-biol. nauk.* 2018;17(2):56–61 (In Russ.)].
2. Емельяничук С.В., Зиматкин С.М. Мозг при холестазе. Гродно: ГрГУ, 2011. 265 с. [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Brain after cholestasis. Grodno: GrGU, 2011. 265 p. (In Russ.)].
3. Емельяничук С.В., Зиматкин С.М. Нарушения в мозге при холестазе и пути коррекции. Гродно: ГрГМУ, 2016. 224 с. [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Disturbances in the brain

- with cholestasis and ways of correction. Grodno: GrGMU, 2016. 224 p. (In Russ.).
4. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинье мозжечка крыс при холестазах. Морфология. 2013;143(2):19–23 [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Structural and histochemical changes in the rat cerebellum Purkinje cells after cholestasis. Morfologiya. 2013;143(2):19–23 (In Russ.)].
 5. Desai R, Frazier AE, Durigon R, Patel H, Jones AW, Dalla Rosa I et al. ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. Brain. 2017;140(6):1595–610. doi:10.1093/brain/awx094.
 6. Dhanda S, Sunkaria A, Halder A, Sandhir R. Mitochondrial dysfunctions contribute to energy deficits in rodent model of hepatic encephalopathy. Metabolic Brain Disease. 2018;33(1):209–23. doi: 10.1007/s11011-017-0136-8.
 7. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. Nature Reviews Neuroscience. 2009;10(7):481–94. doi: 10.1038/nrn2665.
 8. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. 2006; 443(7113):787–95. doi: 10.1038/nature05292.
 9. Пирс Э. Гистохимия: Теоретическая и прикладная. М.: Издательство иностранной литературы, 1962. 962 с. [Pierce A. Histochemistry: Theoretical and applied. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoy literature, 1962. 962 p. (In Russ.)].
 10. Морозов И.А. Топографические особенности ультраструктуры обкладочных клеток слизистой оболочки желудка (морфометрическое исследование). Бюллетень эксперим. биол. и мед. 1976;82(11):1390–4 [Morozov I.A. Topographic features of the ultrastructure of the lining cells of the gastric mucosa (morphometric study). Bjulleten' jeksperim. biol. i med. 1976;82(11):1390–4 (In Russ.)].
 11. Watchko JF. Bilirubin-induced neurotoxicity in the preterm neonate. Clinics in Perinatology. 2016;43(2):297–311. doi: 10.1016/j.clp.2016.01.007.
 12. Yue W, Chen Z, Liu H, Yan C, Chen M, Feng D et al. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. Cell Res. 2014;24:482–96. doi: 10.1038/cr.2014.20.
 13. Bostan AC, Dum RP, Strick PL. Functional anatomy of basal ganglia circuits with the cerebral cortex and the cerebellum. Prog. Neurol. Surg. 2018;33:50–61. doi: 10.1159/000480748.

Информация об авторах/Author information

Сергей Владимирович Емельянчик – кандидат медицинских наук, доцент кафедры зоологии и физиологии человека и животных Гродненского государственного университета им. Я. Купалы.

Sergey V. Emelyanchik – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Zoology and Human and Animal Physiology, Yanka Kupala State University of Grodno.

<https://orcid.org/0000-0003-2408-6729>.

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

Olga Anatolyevna Karnyushko – Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer, Department of Histology, Cytology and Embryology of Grodno State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-2309-1542>.

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

Sergey Mikhailovich Zimatkin – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology of Grodno State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>.

Транскрипционная регуляция морфогенетических процессов в клубочковой зоне коркового вещества надпочечников крыс в постнатальном периоде онтогенеза

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов, Е.П. Тимохина

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Актуальность: роль различных транскрипционных факторов в поддержании плюрипотентности, пролиферации и дифференцировки клеток эндокринных желез взрослого организма мало изучена.

Цель: изучить особенности транскрипционной регуляции постнатального развития клубочковой зоны коркового вещества надпочечников.

Материалы и методы: исследование выполнено на самцах крыс Вистар пубертатного возраста и после достижения половой зрелости на этапе, когда надпочечник достигает максимального развития. Проведены морфологическое исследование надпочечников и определение пролиферативной активности клеток клубочковой зоны и секреции ими альдостерона. Изучены экспрессия факторов Shh, PRH/Hhex и Oct4, а также активация канонического Wnt-сигналинга.

Результаты: в пубертатном периоде клетки клубочковой зоны характеризовались высокой активностью канонического Wnt-сигналинга наряду с экспрессией транскрипционных факторов Shh и Oct4, свидетельствующих о наличии у кортикостероцитов плюрипотентного потенциала. Выявлена выраженная обратная зависимость между численностью Oct4-позитивных клеток в клубочковой зоне и содержанием альдостерона в системном кровотоке. После полового созревания, к моменту наивысшего развития коркового вещества, отмечается активация экспрессии Shh и Oct4, а также антипролиферативного фактора PRH/Hhex при неизменном уровне активации Wnt-сигналинга.

Выводы: полученные данные позволяют выдвинуть новую гипотезу поддержания тканевого гомеостаза клубочковой зоны коркового вещества надпочечника в постнатальном развитии за счет увеличения пула Shh- и Oct4-позитивных клеток.

Ключевые слова: надпочечник, клубочковая зона, Oct4, PRH/Hhex, Shh, Wnt-сигналинг, альдостерон

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

Для цитирования: С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов, Е.П. Тимохина. Транскрипционная регуляция морфогенетических процессов в клубочковой зоне коркового вещества надпочечников крыс в постнатальном периоде онтогенеза. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 48-54. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-48-54

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 08.04.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

Transcriptional regulation of morphogenesis of rat adrenal zona glomerulosa during postnatal development

S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, S.V. Nazimova, V.V. Yaglov, E.P. Timokhina

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Background: transcriptional regulation of endocrine cell pluripotency, proliferation, and differentiation in adult is still obscure.

Objective: asses the network of transcriptional factors regulating postnatal development of rat adrenal zona glomerulosa was studied.

Methods: male Wistar rats of pubertal age and after puberty when the adrenals reach their maximal development were used in the present study. Histology of zona glomerulosa, proliferation of glomerulosa cells, and secretion of aldosterone was examined. Expression of Shh, PRH/Hhex, and Oct4, as well as activation of canonical Wnt signaling in glomerulosa cells was assessed.

Results: pronounced activation of canonical Wnt signaling along with expression of transcriptional factors Shh and Oct4, indicating pluripotent potential were found in glomerulosa cells of pubertal rats. Strong inverse correlation between number of Oct4-positive glomerulosa cells and blood level of aldosterone were also revealed. After

puberty in the period of maximal development of adrenal cortex glomerulosa cells exhibited higher expression of Shh, Oct4, and antiproliferative factor PRH/Hhex along with constant parameters of activation of Wnt signaling. *Conclusion:* Increase in number of Shh- and Oct4-expressing cells allows to hypothesize that this pool is required for maintenance of tissue homeostasis in zona glomerulosa during postnatal development.

Key words: adrenal gland, zona glomerulosa, Oct4, PRH/Hhex, Shh, Wnt signaling, aldosterone

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

For citation: S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, S.V. Nazimova, V.V. Yaglov, E.P. Timokhina. Transcriptional regulation of morphogenesis of rat adrenal zona glomerulosa during postnatal development. *Clin. exp. morphology* (In Russ.). 2019; 8(2): 48-54. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-48-54

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Received 08.04.2019. **Accepted** 04.06.2019

Корковое вещество надпочечников разделено на отдельные стероидогенные зоны, которые ответственны за выработку определенных гормонов, необходимых для поддержания нормального гомеостаза в ответ на различные внутренние и внешние стимулы. Так, клубочковая зона осуществляет синтез минералокортикоидов под контролем ренин-ангиотензивной системы. Внутренняя, пучковая зона, регулируемая гипоталамус-гипофизарно-адреналовой осью, продуцирует глюкокортикоиды, которые координируют обмен углеводов и стрессовые реакции млекопитающих. Цитоархитектоника коры надпочечников крыс претерпевает ряд существенных изменений в неонатальном и пубертатном периодах. Сразу после рождения клетки внутри фетальной коры подвергаются апоптозу, что и приводит к ее инволюции [1]. Затем под влиянием ангиотензина II и адренкортикотропного гормона происходит созревание клубочковой и пучковой зон. Позднее, в препубертатном периоде в надпочечниках между пучковой зоной и мозговым веществом начинает формироваться сетчатая зона. И только после наступления половой зрелости, наконец, завершается морфогенез надпочечников. Корковое вещество надпочечников обладает высокой чувствительностью к действию различных внешних физических и химических факторов и высокой способностью к регенерации [2–4]. Следовательно, для поддержания и функционирования надпочечников необходимо пополнение адренкортикальных клеток из пула соматических клеток-предшественников.

Тем не менее роль различных транскрипционных сигналов в поддержании плюрипотентности, пролиферации и дифференцировки клеток взрослого организма мало изучена по сравнению с клетками эмбриона [5, 6].

Целью настоящего исследования было изучение экспрессии транскрипционных факторов в постнатальном развитии клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 20 самцах крыс Вистар. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 6 недель (n=10), что соответствует пубертатному периоду между адренархе и гонадархе,

и в возрасте 10 недель (n=10), после достижения половой зрелости, когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития [7].

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. Изготавливали препараты экваториальных срезов органа, которые окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия). Гистологические препараты изучали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью программы ImageScope (Leica Microsystems, Германия). Определяли общую площадь коркового вещества, а также площадь клубочковой зоны.

Изучение экспрессии транскрипционных факторов в кортикостероцитах проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител к Oct4 (Abcam, США), Shh (Santa Cruz Biotechnology, США), PRH/Hhex (Abcam, США). Иммуногистохимическое выявление β-катенина в кортикостероцитах клубочковой зоны проводили с использованием моноклональных антител (Cell Marque, США). Активацию канонического Wnt-сигналинга определяли по транслокации β-катенина в ядро [8]. Изучение пролиферации кортикостероцитов проводили методом иммуногистохимии с антителами к Ki-67 (Cell Marque, США). Реакции визуализировали реактивами набора Ultra-Vision LP Detection System (ThermoScientific, США). Производили докраску препаратов гематоксилином Майера. Результаты иммуногистохимических исследований выражали в виде количества иммунопозитивных клеток в 1 мм² площади среза клубочковой зоны.

В сыворотке крови крыс определяли концентрацию альдостерона методом ИФА с помощью наборов (Cusabio, Китай).

Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием программы Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро–Уилка. Для описания центральных тенденций и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, использовали среднее значение и стандартную ошибку

ку среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Корреляционный анализ проводили по критерию Пирсона. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,01$.

Результаты

При гистологическом исследовании корковое вещество надпочечников крыс пубертатного возраста было хорошо развито. В нем выделялись клубочковая, пучковая и сетчатая зоны. Промежуточная зона представляла собой небольшие участки циркулярно расположенных, небольшого размера по сравнению с кортикостероцитами клеток с овальными или неправильной формы гиперхромными ядрами. В разных участках клубочковой зоны выявлялись Oct4-, Shh-, PRH/Nhex- и β -катенин-положительные клетки. Экспрессия ключевого внутриклеточного белка канонического Wnt-сигналинга – β -катенина, транскрипционных факторов Oct4, Shh и PRH/Nhex имела следующие особенности. Наиболее активно экспрессировался β -катенин (рис. 1 А). Приблизительно у трех четвертей клеток он обнаруживался на цитоплазматических мембранах, а у четверти клеток – в ядре (рис. 1 В). Доля клеток с цитоплазматической локализацией была чрезвычайно низкой. Число кортикостероцитов с ядерной локализацией этого антигена было максимальным по сравнению с другими факторами. На втором месте по уровню экспрессии находились транскрипционные факторы Shh и Oct4. Наименее выраженной была экспрессия антипролиферативного фактора PRH/Nhex (рис. 2). Пролиферативные процессы в клубочковой зоне протекали активно, о чем свидетельствует большое количество Ki-67-позитивных кортикостероцитов (рис. 3).

К 10 неделям, когда корковое вещество надпочечника крысы достигло максимального развития за счет увеличения пучковой зоны, отмечалось уменьшение объема клубочковой (рис. 4). Иной стала и экспрессия в ней различных транскрипционных факторов. Выявлено увеличение числа Shh- и Oct4-положительных клеток (рис. 3). После достижения половой зрелости в клубочковой зоне общее число клеток, экспрессирующих β -катенин, уменьшилось вдвое (рис. 1 В). Уменьшение численности иммунопозитивных клеток происходило за счет снижения числа клеток с мембранной локализацией β -катенина, а численность клеток с цитоплазматической и ядерной локализацией не изменялась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 1 Б, В). По сравнению с пубертатным периодом количество клеток, экспрессирующих PRH/Nhex, увеличилось, а Ki-67 – уменьшилось. Таким образом, в клубочковой зоне наиболее активно транслоцировался в ядро транскрипционный фактор Shh. Вторым по уровню транслокации был β -катенин, третьим – Oct4. PRH/Nhex характеризовался наименьшей экспрессией

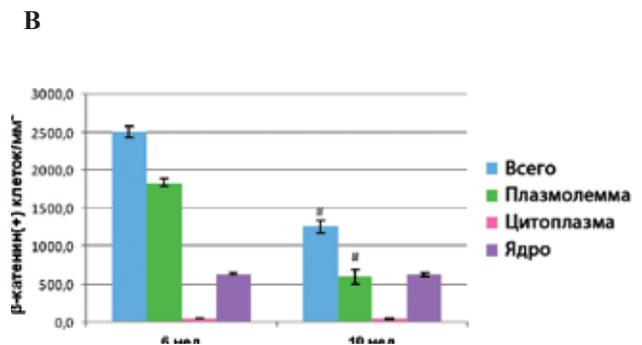
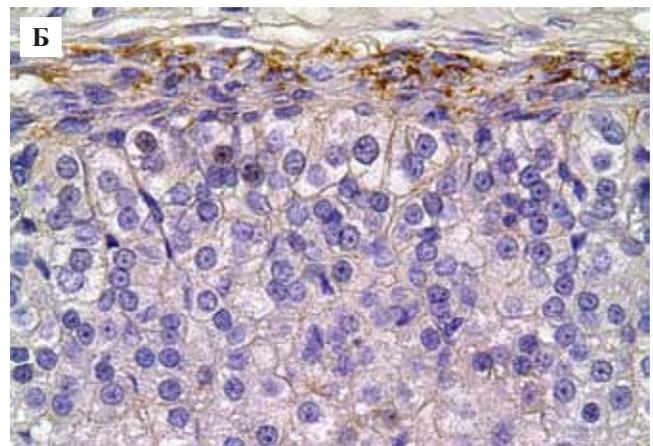
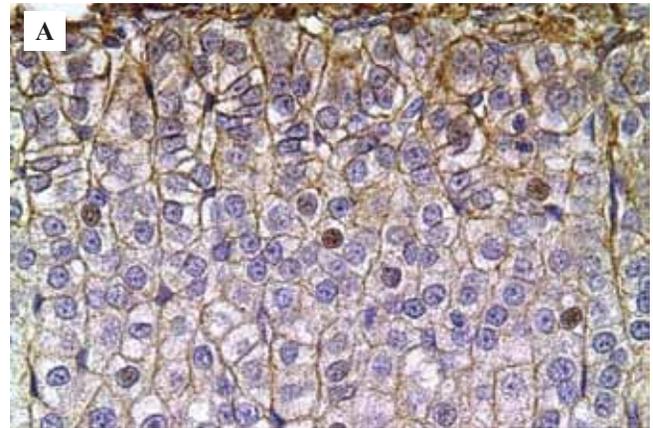


Рис. 1. Экспрессия β -катенина кортикостероцитами клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крысы.

А – в пубертатном (6 недель) и Б – постпубертатном (10 недель) периодах. $\times 800$, В – количество β -катенин-позитивных кортикостероцитов с различной локализацией антигена ($M \pm m$)
– статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

Fig. 1. Expression of β -catenin in glomerulosa cells of rat adrenal cortex.

А – in pubertal period (6 weeks age), Б – after puberty (10 weeks age), $\times 800$, В – quantification of glomerulosa cells with different subcellular localization of β -catenin
– $p < 0,01$ compared to the pubertal period

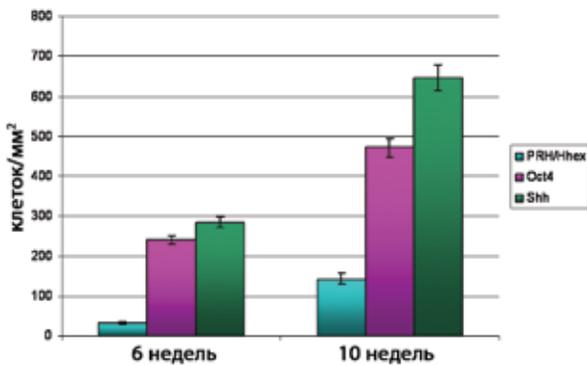


Рис. 2. Экспрессия транскрипционных факторов Hhex, Oct4 и Shh кортикостероцитами клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном (6 недель) и постпубертатном (10 недель) периодах, (M±m)
– статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

Fig. 2. Expression of transcriptional factors Hhex, Oct4, and Shh in glomerulosa cells of rat adrenal cortex in pubertal (6 weeks age) and postpubertal (10 weeks age) periods, (M±m)
– $p < 0,01$ compared to the pubertal period

в кортикостероцитах, как и в предыдущем сроке исследования. Корреляционный анализ установил наличие сильной обратной связи между количеством PRH/Hhex и Ki-67-позитивных клеток в постнатальном развитии ($R = -0,97$, $p = 0,000002$).

Проведенное определение концентрации альдостерона в сыворотке крови крыс показало, что, несмотря на уменьшение размеров клубочковой зоны, уровень альдостерона повысился к 10-недельному возрасту (рис. 5). Корреляционный анализ выявил существование выраженной обратной связи между продукцией альдостерона и численностью Oct4-позитивных кортикостероцитов как в пубертатном ($R = -0,98$, $p = 0$), так и в постпубертатном периодах ($R = -0,83$, $p = 0,0058$).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что постнатальное развитие клубочковой зоны коркового вещества надпочечников сопровождается изменением экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих основные морфогенетические процессы – пролиферацию и дифференцировку клеток. Известно, что канонический Wnt-сигналинг играет ключевую роль в формировании зональности фетальной коры и функциональном становлении клубочковой зоны [8]. В пубертатном периоде, когда продолжается развитие коркового вещества, активация Wnt-сигналинга в кортикостероцитах происходила интенсивно на фоне высокой пролиферативной активности. Уровень экспрессии β -катенина опережал экспрессию фактора Shh, также обеспечивающего деление и созревание кортикостероцитов.

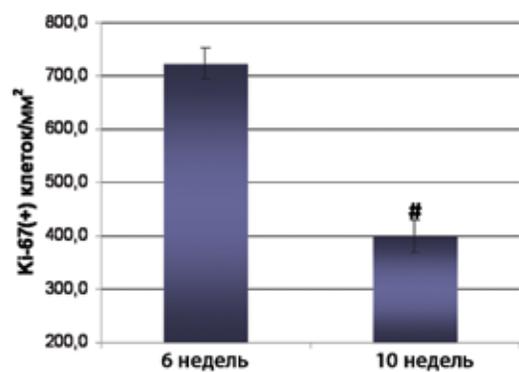


Рис. 3. Экспрессия Ki-67 кортикостероцитами клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном (6 недель) и постпубертатном (10 недель) периодах, (M±m)
– статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

Fig. 3. Quantification of Ki-67-expressing glomerulosa cells in pubertal (6 weeks age) and postpubertal (10 weeks age) periods, (M±m)
– $p < 0,01$ compared to the pubertal period

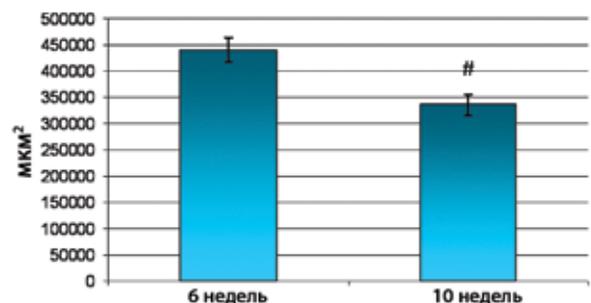


Рис. 4. Изменения площади клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном (6 недель) и постпубертатном (10 недель) периодах, (M±m)
– статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

Fig. 4. Surface area of zona glomerulosa in pubertal (6 weeks age) and postpubertal (10 weeks age) rats, (M±m)
– $p < 0,01$ compared to the pubertal period

После достижения максимальной степени развития органа, когда снижается пролиферативная активность клеток, показатели активации Wnt-сигналинга не изменяются. Вероятно, это необходимо для обеспечения регуляции гормоногенеза в кортикостероцитах, так как Wnt-сигналинг стимулирует экспрессию рецепторов ангиотензина [9]. Повышение продукции альдостерона у 10-недельных крыс происходит на фоне уменьшения размеров клубочковой зоны. В наших предыдущих исследованиях показано, что это изменение обусловлено повышением стероидогенного потенциала клеток в постпубертатном периоде путем перестройки

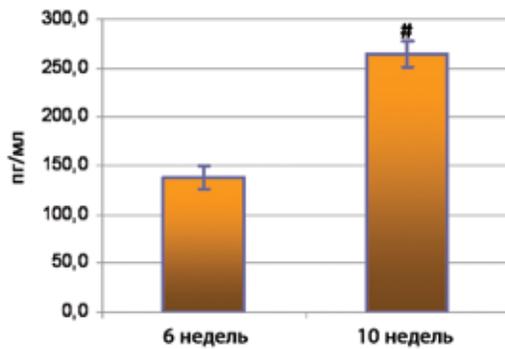


Рис. 5. Концентрация альдостерона в сыворотке крови крыс в пубертатном (6 недель) и постпубертатном (10 недель) периодах, (M±m)
– статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

Fig. 5. Aldosterone serum concentration in pubertal (6 weeks age) and postpubertal (10 weeks age) rats, (M±m)
– $p < 0,01$ compared to the pubertal period

их секреторного аппарата [10], что позволяет усилить синтез гормонов даже при уменьшении числа клеток-продуцентов. Вероятно, что и поддержание стабильного уровня активации Wnt-сигналинга также необходимо для усиления синтетических процессов в клетках. Двукратное повышение экспрессии индуктора плюрипотентности Oct4 в кортикостероцитах в составе клубочков указывает на формирование пула клеток, способных переходить в менее дифференцированное состояние. На создание такого пула указывает также и трехкратное снижение числа клеток с мембранной локализацией β -катенина. Известно, что β -катенин совместно с E-кадгеринном входит в состав плотных межклеточных контактов, то есть способствует снижению пролиферативного потенциала клеток за счет усиления контактного торможения [11]. Таким образом, уменьшение числа клеток с мембранной локализацией β -катенина и увеличение экспрессии Oct4 можно рассматривать как механизмы самообновления кортикостероцитов клубочковой зоны при физиологической регенерации. Повышение другого фактора, способствующего переходу в менее дифференцированное состояние и активации пролиферативных процессов, – Shh [12–15], также указывает на создание пула кортикостероцитов, готовых к самообновлению. То, что экспрессия Oct4 и Shh наблюдалась не в клетках промежуточной зоны или под капсулой, а в клетках, входящих в состав клубочков и имеющих типичную структуру кортикостероцитов, указывает именно на готовность дифференцированных клеток к переходу в плюрипотентное состояние, а не на появление или увеличение недифференцированных предшественников как источников для физиологической регенерации клубочковой зоны. Наличие обратной зависимости между числом Oct4-позитивных кортикостероцитов и продукцией альдостерона также свидетельствует об этом. Сопо-

ставление численности клеток с ядерной локализацией β -катенина и Shh в постнатальном периоде онтогенеза показывает, что при завершении развития клубочковой зоны она становится одинаковой. Так, известно, что прогениторные адренкортикальные клетки и дифференцированные клетки клубочковой зоны, продуцирующие Shh, чувствительны к Wnt-сигналингу [16]. Эти данные могут указывать на совместную регуляцию гомеостаза клубочковой зоны с обеспечением рецепторного аппарата, необходимого для контроля секреторной активности Wnt-сигналингом и поддержания самообновления клеток за счет активности Shh. Все это свидетельствует о широком спектре регуляторных механизмов, которые оказывают существенное влияние на возможности адаптации в зависимости от внешнего или внутреннего стимула.

Роль транскрипционного фактора PRH/Hhex, обладающего выраженной антипролиферативной активностью, в постнатальном развитии клубочковой зоны ранее не была изучена. В наших работах впервые были показаны экспрессия PRH/Hhex в корковом и мозговом веществе надпочечников и его антипролиферативное действие [17, 18]. В настоящем исследовании продемонстрировано: экспрессия PRH/Hhex и Ki-67 имеет выраженную обратную зависимость, что подтверждает антипролиферативную роль этого фактора в развитии клубочковой зоны. Активацию PRH/Hhex на фоне увеличения экспрессии Oct4 и Shh, а также снижения содержания β -катенина в наружных мембранах можно рассматривать как фактор, необходимый для баланса между пролиферацией и готовностью клеток к переходу в плюрипотентное состояние.

Сформировавшиеся к половозрелому периоду функциональные зоны надпочечников сохраняются в течение всей жизни, хотя их размер может изменяться в ответ на физиологические раздражители, обусловленные активностью ренин-ангиотензиновой системы и гипоталамо-гипофизадреналовой оси [19–21]. Для такой реакции необходимо обеспечивать постоянный уровень обновления клеток в стероидогенных зонах. Традиционно считалось, что это происходит за счет пролиферации клеток коры надпочечников в клубочковой и наружной части пучковой зон, которые медленно центростремительно мигрируют в глубь железы, по направлению к мозговому веществу надпочечника [21, 22]. Эти наблюдения позволили предположить, что существуют адренкортикальные стволовые или прогениторные клетки, расположенные либо в периферической части коркового вещества, либо в капсуле [23]. Выявление в паренхиме коркового вещества надпочечника Oct4- и Shh-позитивных клеток позволяет переосмыслить существующую концепцию постнатального морфогенеза и физиологической регенерации органа. Увеличение числа Oct4- и Shh-позитивных клеток в постпубертатном периоде может свидетельствовать о двух независимых путях реализации процессов регенерации органа. Возможно, эта тонкая регуляция

необходима для дифференцированного подхода к воздействию различных стрессорных факторов.

Таким образом, результаты настоящего исследования впервые показывают экспрессию транскрипционного фактора Oct4 в клубочковой зоне и его роль совместно с Shh и PRH/Hhex, а также активацией Wnt-сигналинга в постнатальном морфогенезе клубочковой зоны. Полученные данные позволяют выдвинуть новую гипотезу поддержания тканевого гомеостаза клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крысы, заключающуюся в формировании среди высокодифференцированных кортикостероцитов пластичного пула клеток, готовых к переходу в плюрипотентное состояние.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – Н.Н.В., С.С.О., В.В.Я.
Сбор и обработка материала – С.В.Н., С.С.О., Е.П.Т.
Статистическая обработка данных – Н.В.Я.
Написание текста – С.С.О.
Редактирование – В.В.Я., Н.В.Я.

Литература/References

- Ishimoto H, Jaffe R. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the fetoplacental unit. *Endocr Rev*. 2011;32(3):317–55. doi: 10.1210/er.2010-0001.
- Bruder E, Nagler A, Raff H. Oxygen-dependence of ACTH-stimulated aldosterone and corticosterone synthesis in the rat adrenal cortex: developmental aspects. *J Endocrinol*. 2002;172(3):595–604. doi: 10.1677/joe.0.1720595.
- Lorente M, Mirapeux R, Miguel M, Longmei W, Volk D, Cervos-Navarro J. Chronic hypoxia induced ultrastructural changes in the rat adrenal zona glomerulosa. *Histol Histopathol*. 2002;17:185–90. doi: 10.14670/HH-17.185.
- Yaglova NV, Tsomartova DA, Yaglov VV. Differences in Production of Adrenal Steroid Hormones in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of the Endocrine Disruptor DDT during Prenatal and Postnatal Development. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2018,12(1):80–6. doi: 10.1134/S1990750818010122.
- Olariu V, Lövkvist C, Sneppen K. Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency. *Sci Rep*. 2016;6:25438. doi: 10.1038/srep25438
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 2010;463(7284):1035–41. doi: 10.1038/nature08797.
- Pignatelli D, Xiao F, Gouvtia A, Ferreira J, Vinson G. Adrenarche in the rat. *J Endocrinol*. 2006;191(1):301–8. doi: 10.1677/joe.1.06972.
- Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/b-catenin signaling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;35:87–95. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.009.
- Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S., Tissier F, Amar L et al. WNT/β-catenin signaling is activated in aldosterone producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):889–905. doi: 10.1093/hmg/ddt484
- Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Следнева Ю.П., Яглов В.В. Изменения кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс при воздействии низких доз ДДТ в постнатальном развитии. *Клин. эксп. морфология*. 2018;2:25–30 [Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Sledneva Y.P., Yaglov V.V. Cytophysiology of adrenal zona glomerulosa cells of rats exposed to low doses of DDT during postnatal development. *Clin. exp. morphology*. 2018;2:25–30 (In Russ.)]. doi: 10.31088/2226-5988-2018-26-2-25-30
- Balda MS, Matter K. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1788:761–7. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.11.024.
- Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2:237–50. doi: 10.1177/1758834010366430.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoan. *Nat Rev Genet*. 2011;12:393–406. doi: 10.1038/nrg2984.
- King PJ, Guasti L, Laufer E. Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *J Endocrinol*. 2008;198:439–50. doi: 10.1677/JOE-08-0161.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1–114. doi: 10.1016/S0070-2153(03)53002-2.
- Walczak E, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, Hammer GD. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2014;28(9):1471–86. doi: 10.1210/me.2014-1060.
- Яглова Н.В., Обернихин С.С., Цомартова Д.А., Назимова С.В., Яглов В.В. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Hhex в хромоаффинных клетках надпочечников в постнатальном развитии и его роль в регуляции пролиферативных процессов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018;165(4):505–508 [Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Nazimova S.V., Yaglov V.V. Expression of Transcription Factor PRH/Hhex in Adrenal Chromaffin Cells in the Postnatal Development and Its Role in the Regulation of Proliferative Processes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(4):508–511]. doi: 10.1007/s10517-018-4205-8.
- Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Регуляция пролиферативных процессов в корковом веществе надпочечников крыс транскрипционным фактором PRH при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(3):381–5 [Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Yaglov V.V. Dysregulation of proliferation control by transcriptional factor PRH in rat adrenal cortex induced by developmental exposure to endocrine disruptor DDT. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(3):381–5 (In Russ.)].
- Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N.Y.*

- Acad Sci. 2003;995:59–72. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03210.x.
20. *Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y.* The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1619:317–24. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00490-7.
21. *Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP.* Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E965–E973. doi: 10.1152/ajpendo.00070.2006.
22. *King PJ, Paul A, Laufer E.* Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:21185–90. doi: 10.1073/pnas.09094711106.
23. *Wood MA, Hammer GD.* Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336:206–12. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.012.

Информация об авторах/Author information

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Natalya V. Yaglova – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of the Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology.

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

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Sergey S. Obernikhin – Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of the Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology.

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

Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Svetlana V. Nazimova – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of the Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology.

<http://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Valentin V. Yaglov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Researcher, Laboratory of the Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology.

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

Екатерина Петровна Тимохина – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Ekaterina P. Timokhina – Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher, Laboratory of the Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology.

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

Применение срезов органных внеклеточных матриц для 3D культивирования

А.Ю. Пульвер¹, Б.Е. Лейбович¹, Р.А. Полтавцева², Г.А. Давыдова³, А.Н. Шевцов¹, И.И. Селезнева^{2,3}, С.В. Павлович², Н.А. Пульвер¹, Е.А. Раскина¹, А.В. Волков¹, А.С. Сундеев¹, С.Г. Путилин¹, И.В. Савинцева³, Г.Т. Сухих²

¹ НПО ООО «Институт биологии старения», Воронеж, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино Московской области, Россия

Актуальность: в последние десятилетия децеллюляризация органов стала устоявшейся техникой в области регенеративной медицины для получения сложных биоскаффолдов. Кроме того, *in vitro* было продемонстрировано, что таковые сохраняют свою природную тканеспецифичность.

Цель исследования: разработка методики получения срезов внеклеточных матриц матки и яичников человека.

Материалы и методы: срезы внеклеточных матриц матки и яичников человека толщиной 50 мкм были получены на криомикротоме, после чего проходили последовательную обработку детергентами (1% раствор додецилсульфата натрия) и 10% эмбриональной телячьей сывороткой для удаления резидуальной ДНК и лиофильную вакуумную сушку с последующей патоморфологической оценкой сохранности и качества срезов после лиофилизации и оценкой влияния на жизнеспособность подсеяемых клеток посредством заселения клеточными культурами.

Результаты: описан способ получения полноценных тканеспецифичных субстратов для роста трехмерных клеточных культур большой плотности *in vitro*.

Выводы: разработанная методика получения срезов может быть применена для удобной и недорогой замены широко использующихся в фармакологии и токсикологии прецизионных срезов тканей.

Ключевые слова: 3D клеточные культуры, внеклеточный матрикс, гинекология и репродуктивная медицина, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, тканевая инженерия, эндометрий

Для корреспонденции: Борис Ефимович Лейбович. E-mail: bel.46@mail.ru

Для цитирования: А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева, Г.А. Давыдова, А.Н. Шевцов, И.И. Селезнева, С.В. Павлович, Н.А. Пульвер, Е.А. Раскина, А.В. Волков, А.С. Сундеев, С.Г. Путилин, И.В. Савинцева, Г.Т. Сухих. Применение срезов органных внеклеточных матриц для 3D культивирования. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 55-63. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-55-63

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила: 14.05.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

Application of precision cut organ extracellular matrix slices for 3D cultivation

A.Yu. Pulver¹, B.E. Leibovich¹, R.A. Poltavtseva², G.A. Davydova³, A.N. Shevtsov¹, I.I. Selezneva^{2,3}, S.V. Pavlovich², N.A. Pulver¹, E.A. Raskina¹, A.V. Volkov¹, A.S. Sundeev¹, S.G. Putilin¹, I.V. Savintseva³ and G.T. Sukhikh²

¹ R&B «Institute of Biology of Aging», LLC, Voronezh, Russia

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia

Relevance: in recent decades, the organ decellularization has become an established technique in the regenerative medicine for obtaining complex bioscaffolds. In addition, it was demonstrated *in vitro* that they retain their natural tissue specificity. The article describes the varieties and methods for producing tissue-engineered scaffolds that mimic natural extracellular matrices obtained by non-perfusion methods in most cases.

Aim of the study: development of methods for obtaining sections of extracellular matrices (ECM) of the uterus and human ovaries.

Materials and methods: 50 µm thick ECM human uterus and ovary slides have been obtained by cryomicrotome sectioning, followed by sequential detergent (1% sodium dodecyl sulfate solution, v/w) treatment and 10% w/w fetal calf serum application for residual DNA removal, accomplished by freeze-drying with subsequent pathological assessment of ECM slides preservation quality via cell viability evaluation by means of cell culture colonization.

Research results: we offer a method of precision cut human uterine and ovarian extracellular matrix scaffold slices preparation in the capacity of full-fledged *in vitro* tissue-specific media for three-dimensional high density cell culture.

Conclusions: the technique developed could be used for convenient and affordable surrogation of precision cut tissue slices widely applicable in pharmacology and poison control.

Key words: 3D cell cultures, extracellular matrix, gynecology and reproductive medicine, mesenchymal multipotent stromal cells, tissue engineering, endometrium

Corresponding author: Boris E. Leibovich. E-mail: bel.46@mail.ru

For citation: A.Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva, G.A. Davydova, A.N. Shevtsov, I.I. Selezneva, S.V. Pavlovich, N.A. Pulver, E.A. Raskina, A.V. Volkov, A.S. Sundeev, S.G. Putilin, I.V. Savintseva, G.T. Sukhikh. Application of precision cut extracellular matrix slices for 3d cultivation. Clin. exp. morphology. (In Russ.). 2019; 8(2): 55-63. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-55-63

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.05.2019. Accepted 04.06.2019

Органные внеклеточные матриксы (ВКМ) больше всех остальных типов ВКМ (хотя это, конечно, главным образом зависит от протокола децеллюляции) напоминают тот орган, из которого были произведены. Тем не менее тканеспецифичные ВКМ, получаемые бесперфузионным способом (как правило, более длительным, но менее трудоемким и не требующим специального, зачастую дорогостоящего оборудования), из-за отсутствия сохранной циркуляторной сети нередко более удобны в исследовательской работе. Этим они напоминают широко используемые в фармакологии, токсикологии и патофизиологии прецизионные срезы тканей (ПСТ), в значительной степени сохраняющие архитектуру «родительского» органа, клеточную гетерогенность и связи клетка–клетка и клетка–ВКМ, обнаруженные *in vivo* [1–5].

Из-за небольшого линейного размера и толщины срезов, а также широко коммерчески доступного оборудования – микротомов, а лучше вибромикротомов легко производить большое количество срезов из одного органа за короткий промежуток времени. Работать с ними можно практически так же, как с обыкновенными 3D клеточными культурами. Это существенно упрощает, ускоряет и удешевляет работу, в большинстве случаев не слишком влияя на конечный результат.

Получение и характеристика срезов ВКМ матки и яичников человека

В рамках научно-исследовательской работы нашими организациями были совместно проведены получение и характеристика ВКМ матки и яичников человека, адаптированных для использования *in vitro* наподобие упоминавшихся выше ПСТ, потенциально столь же удобных для практического применения. По сути дела, они представляют собой полноценные тканеспецифичные среды для роста трехмерных клеточных культур большой плотности.

Аутопсийный материал (матка с маточными трубами и яичниками), полученный от пациентки 50 лет, умершей от послеоперационной тромбоэмболии легочных артерий, в целом признан пригодными для получения ВКМ.

Промывание сосудистого русла

Сосудистое русло отмыто 5 литрами гепаринизированного (20 ЕД/мл) изотонического раствора с добавлением 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), при перфузионном давлении 100–140 мм рт. ст. (скорость перфузии – 60–70 мл/мин) в течение ~1,5 часа. Визуально орган в процессе перфузии практически не менялся.

Получение срезов ВКМ

Линейные размеры человеческих яичников (рис. 1, 4 А) вполне позволяют размещать их в шестилучных культуральных планшетах, поэтому яичники целиком фиксировали термостатом к рабочей площадке криомикротомы StyoStat Leica CM1510 (Германия), охлаждали до –18°C, и получали срезы толщиной 50 мкм (возможная максимальная толщина срезов, получаемых на этом криомикротоме).

Для стенки матки (эндометрий + миометрий – в силу малой толщины эндометрия изолировать таковой не представляется возможным) с целью максимально возможной унификации было решено получать срезы маточного ВКМ размерами, близкими к диаметру лунок 24-луночных культуральных планшетов.

В фиксированном термостатом к рабочей площадке образце ткани матки, охлажденном до –18°C, при помощи циркулярной алмазной фрезы высверливали цилиндр диаметром 16 мм на глубину примерно 10 мм. После этого делали серию срезов толщиной 50 мкм каждый. Вследствие недостаточно низкой температу-

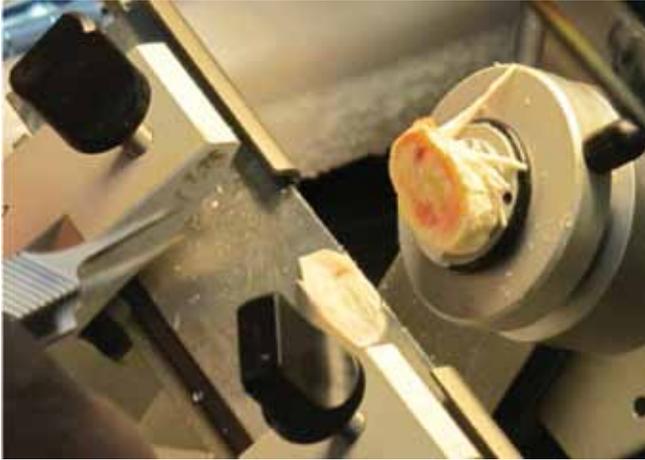


Рис. 1. 50 мкм срез яичника на криомикротоме
Fig. 1. 50 µm ovarian cryomicrotome sectioning



Рис. 2. Фрезерованный вырез в замороженном эксплантате D×8 мм
Fig. 2. Frozen explant D×8 mm milled cut



Рис. 3. 50 мкм срез маточной стенки на криомикротоме
Fig. 3. 50 µm uterine wall cryomicrotome sectioning

ры замораживания перед высверливанием цилиндра образцы получились с незначительными дефектами, но в целом пригодными для дальнейшей работы (рис. 2, 4 Б).

Из подготовленных образцов стенки матки так же, как в случае с яичниками, с помощью криомикротомы Cryostat Leica CM1510 получали срезы толщиной 50 мкм (рис. 3).

Полученные срезы немедленно помещали на дно лунок плоскодонных культуральных планшетов.

Срезы яичников (три штуки) помещали в полистироловые 6-луночные планшеты (Corning-Costar, США). Срезы маточной стенки (12 штук) помещали в аналогичные 24-луночные планшеты.

Срезы органных матриксов в каждом случае размещали в половину планшетных лунок (прочие оставались пустыми для возможности проведения в будущем

различных контрольных экспериментов). Все использованные планшеты имели поверхность, обработанную для оптимального прикрепления клеток (CellBIND). Это совершенно не требуется для матрикса, представляющего собой сплошную поверхность для клеточной адгезии (для него могут быть использованы планшеты с необработанной поверхностью для суспензионных культур), но для контрольных экспериментов адгезионные поверхности желательны.

Помещение срезов ВКМ в культуральных планшетах и децеллюляризация

Децеллюляризация срезов ВКМ проводилась по видоизмененной и переработанной методике [6]: после размещения срезов матриксов на дне лунок культуральных планшетов на них наслаивалось (с целью исключения съезживания/перекручивания матриксно-



Рис. 4. Размещение срезов органных ВКМ в культуральных планшетах.

А – срезы яичников в 6-луночном планшете, Б – срезы маточной стенки в 24-луночном планшете

Fig. 4. Placing precision cut ECM slices in culture plates.

А – ovarian sections in a 6-well plate, Б – uterine wall sections in a 24-well plate

го лоскута) по 15 мл (для 6-луночных) или по 2 мл (для 24-луночных) 1% раствора додецилсульфата натрия (AppliChem GmbH, Германия) в физиологическом растворе с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, БиолоТ, Россия). Планшеты инкубировались на орбитальном шейкере со скоростью 120 об/мин в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего жидкость осторожно аспирировали и матриксы трехкратно промывали таким же объемом физиологического раствора.

Постпроцессинг срезов ВКМ (удаление остаточной ДНК и подготовка к лиофилизации)

Во многих тканевоинженерных научных работах нарочито заостряется опасность остаточной ДНК [7, 8], на наш взгляд, несколько переоцененная [9]. В ЭТС, повсеместно используемой в культуре клеток, достаточно нуклеаз, чтобы расщепить все нуклеиновые кислоты уже при концентрации 2,5% [10]. С этой целью после отмывания матриксов от децеллюляризаторов состав жидкости сменялся на 10% ЭТС в физиологическом растворе с 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Планшеты ротировали на орбитальном шейкере с той же скоростью при +4°C в течение шести суток с ежедневной сменой раствора.

По завершении в целях подготовки к лиофилизации (для предохранения трехмерной структуры тканевых каркасов [9]) инкубационный раствор в лунках заменяли на 5% раствор трегалозы (Лабтех, Россия) на физиологическом растворе с добавлением с 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

Сублимационная вакуумная сушка ВКМ

Для возможности длительного (более 6 месяцев) хранения культуральные планшеты со срезами ВКМ после предварительного замораживания были подвергнуты сублимационной вакуумной сушке в лиофильной сушилке «ИНЕЙ-4» (ИБП РАН, Россия). Перед началом заморозки наружную поверхность планшетов и внутреннюю поверхность вакуумных пакетов обрабатывали 70% этиловым спиртом, после чего планшеты размещали в пакетах. Сразу после окончания лиофилизации пакеты вакуумировали при помощи бытового вакууматора.

Контроль стерильности

Трупные органы, изымаемые без соблюдения асептики в условиях патологоанатомического отделения, склонны к контаминации различными микроорганизмами.

Процесс химической децеллюляризации в силу токсичности применяемых веществ сам по себе имеет антисептический характер, однако наш собственный опыт свидетельствует (неопубликованные данные) о невозможности 100% исключения бактериальной контаминации, что обычно вынуждает использовать антисептические агенты (вплоть до ионизирующего излучения),

которые могут дополнительно повреждать функционально важные гликопротеины и мукополисахариды ВКМ. Вакуумная сублимация (лиофилизация) позволяет не только длительно хранить органные матриксы при комнатной температуре, но и стерилизовать их, убивая вегетирующие микроорганизмы. К сожалению, покоящиеся споры таким способом полностью уничтожить невозможно, поэтому исключить вероятность роста грибов нельзя. Для борьбы с грибами можно использовать различные добавки в состав культуральной среды (чаще всего применяется амфотерицин В в концентрации 2,5 мг/л вместе с пенициллином и стрептомицином).

Патоморфологическая оценка сохранности и качества срезов ВКМ после лиофилизации

На макроуровне срезы выглядят полупрозрачными, однородными, объемная структура ткани в целом сохранена, признаков отека нет (рис. 4–6).

Структура матрикса несколько нарушена из-за микрорастрескивания (рис. 6 А, Д), так как перед нарезкой он замораживался в отсутствие внеклеточных криопротекторов, предохраняющих трехмерную структуру тканевых каркасов. Впрочем, для культурального применения это даже может являться преимуществом, так как такого характера повышение пористости субстрата может облегчать клеточную миграцию в толщу подложки.

При гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином (рис. 6) определяется полное отсутствие клеточных ядер и тканевого детрита.

Заселение полученных ВКМ клеточными культурами

Сравнительный цитоморфометрический анализ пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), растущих на срезах органных внеклеточных матриксов матки и яичников человека, проводили в сравнении с ростом МСК на поверхности культурального пластика без покрытия.

В эксперименте использовали трансгенную культуру стволовых клеток пульпы зуба на 2-м пассаже, трансдуцированных лентивектором LVT-TagGFP2 (Евроген, Россия) по протоколу Moffat et al. [11], тем самым получая трансгенную клеточную культуру DPSC, несущую ген флуоресцентного зеленого белка (GFP-DPSC).

Клеточную культуру 2-го пассажа помещали в 24-луночный планшет в количестве 10^4 клеток на лунку. Через сутки культивирования в ростовую среду вносили 10^5 лентивирусных частиц, далее через сутки меняли культуральную среду. На третьи сутки после заражения в клетках наблюдали развитие экспрессии GFP по уровню флуоресценции, добавляли антибиотик пуромидин 2 мкг/мл (Santa Cruz, США) и производили селекцию клеток на антибиотике в течение пяти дней. Полученную культуру клеток (GFP-DPSC) использовали для исследования образцов материалов.

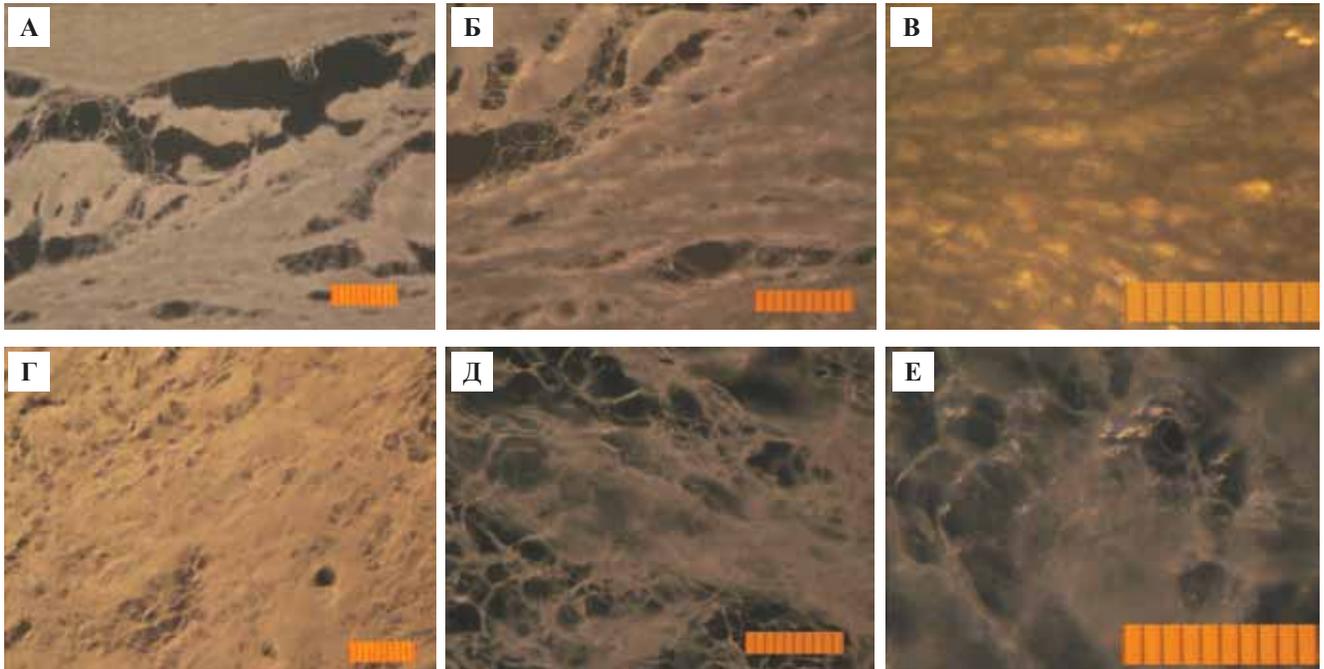


Рис. 5. Срезы органических ВКМ под разным увеличением (фазовый контраст)

А, Б, В – миометриальный/эндометриальный ВКМ, Д, Е – овариальный ВКМ (размер деления шкалы – 1 мкм)

Fig. 5. Precision cut ECM slices under different magnification settings (phase contrast)

А, Б, В – myometrial/endometrial ECM, Д, Е – ovarian ECM (scale bar division is 1 μm)

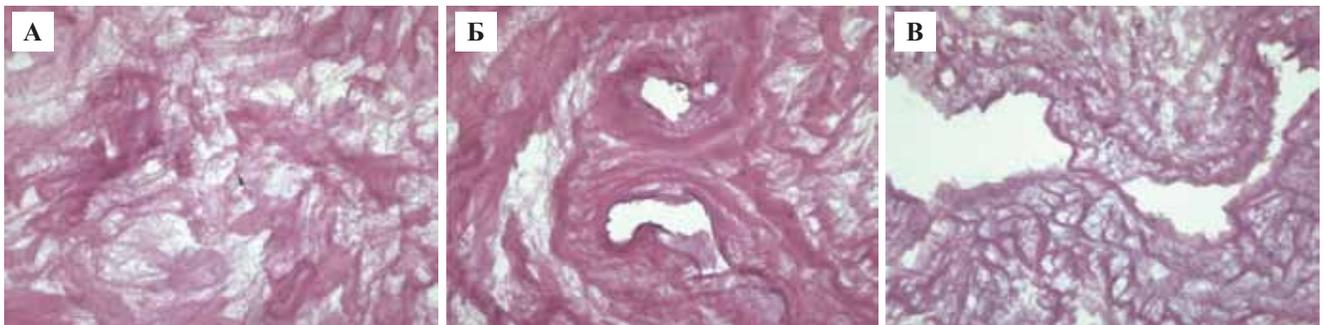


Рис. 6. Срезы органических ВКМ, окраска гематоксилином и эозином, $\times 630$ (толщина 50 мкм).

А, Б – миометриальный/эндометриальный ВКМ, В – овариальный ВКМ

Fig. 6. Precision cut ECM organ slices, hematoxylin-eosin stain, $\times 630$ (50 μm thickness)

А, Б – myometrial/endometrial ECM, В – ovarian ECM

Определение цитотоксичности и оценка влияния ВКМ на жизнеспособность клеток

Оценку жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии исследуемых веществ проводили на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Микроскопию клеток с фотографией осуществляли через 24 часа, 72 часа и 168 часов (одни сутки, трое суток и семь суток) от начала инкубации. На седьмые сутки для проведения анализа применяли метод флуоресцентного окрашивания клеток, используя набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Великобритания), в который входят два флуоресцентных красителя: SYTO 9 и иодид пропидия (рис. 7). Флуоресцентный краситель SYTO 9 в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 450\text{--}490$ нм,

$\lambda_{\text{эмисс}} = 515\text{--}565$ нм окрашивает в зеленый цвет ДНК и РНК живых и мертвых клеток. Интеркалирующий реагент иодид пропидия в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 546$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 575\text{--}640$ нм окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток.

Для определения цитотоксичности материалов для клеток использовали метод прямого контакта. Образцы матриц помещали стерильно в лунки 24-луночного планшета, добавляли 1 мл среды DMEM (ПанЭко, Россия) со 100 ЕД/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицина и помещали в CO_2 -инкубатор при температуре 37°C , содержании CO_2 5% на семь суток с ежедневной сменой среды. Через 72 часа проводили смену среды и на поверхность матриц вносили клетки в концентрации 25 тыс. клеток/ cm^2 в среде DMEM/F12 (ПанЭко

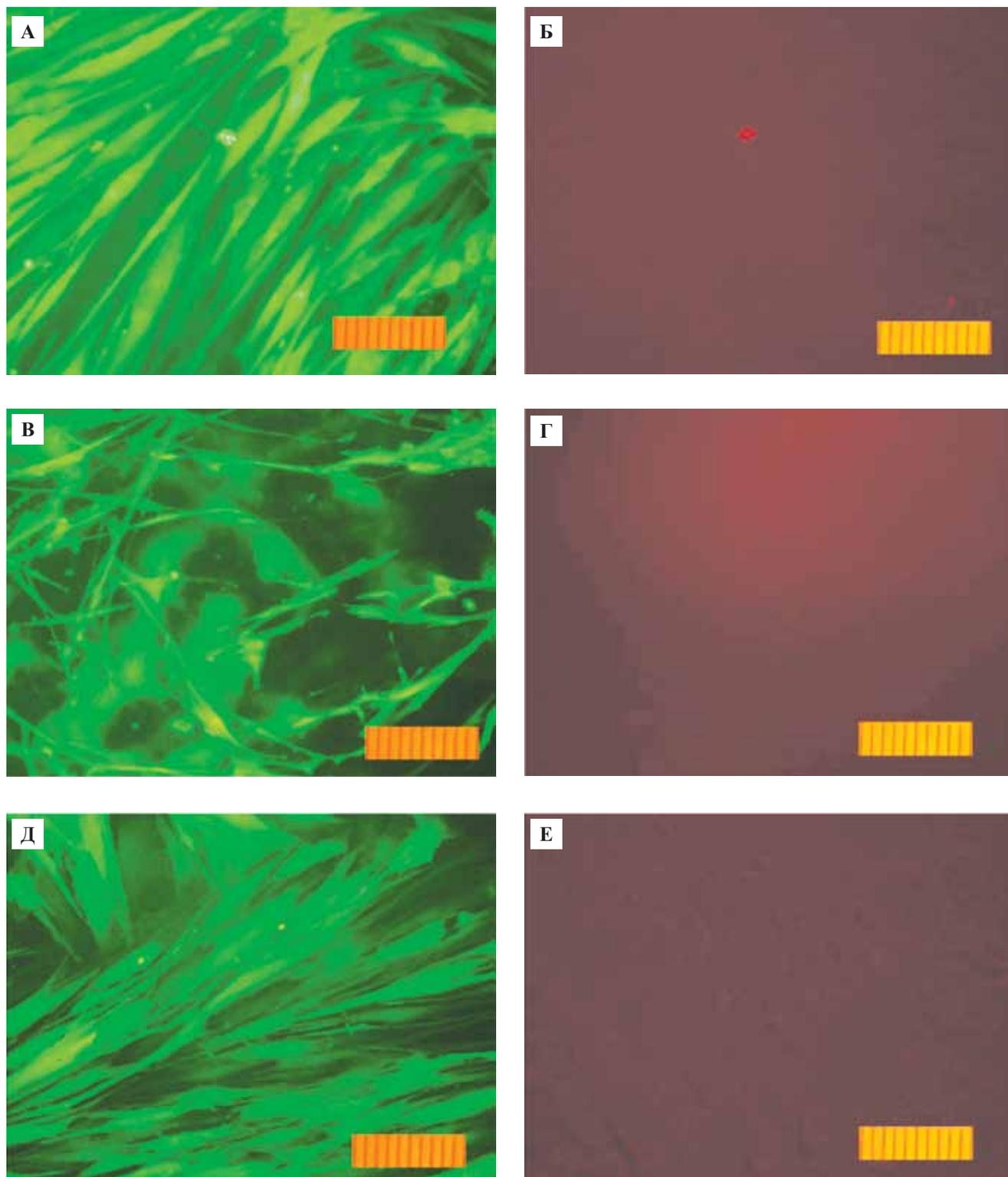


Рис. 7. Микропрепараты 3D клеточных культур DPSC на седьмые сутки (168 часов) инкубации на различных субстратах. А – контроль (культуральный пластик), SYTO 9, Б – контроль, йодид пропидия, В – миометриальный/эндометриальный ВКМ, SYTO 9, Г – миометриальный/эндометриальный ВКМ, йодид пропидия, Д – овариальный ВКМ, SYTO 9, Е – овариальный ВКМ, йодид пропидия. Размер деления шкалы – 1 мкм

Fig. 7. DPSC 3D cell culture slide mounts on the 7th day (168 hours) of incubation period with various substrates: А – control (culture plastic), SYTO 9, Б – propidium iodide control, В – myometrial/endometrial ECM, SYTO 9, Г – myometrial/endometrial ECM, propidium iodide, Д – ovarian ECM, SYTO 9, Е – ovarian ECM, propidium iodide (scale bar division is 1 μm)

Россия), содержащей 5% ЭТС и 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, помещали в CO₂-инкубатор при температуре 37°C. В качестве контроля клетки были помещены на культуральный пластик. Каждые 48 часов проводили смену среды.

Следует отдельно отметить необходимость обязательного неоднократного отмывания образцов лиофилизированного ВКМ от избытка трегалозы, способного вызывать закисление культуральной среды и клеточную гибель.

Выводы – цитотоксичность ВКМ при правильной подготовке практически отсутствует: клетки по жизнеспособности не отличаются от контроля (жизнеспособность близка к 100%). Скорость клеточной пролиферации также практически не отличается от контроля. Как видно на рисунках 7 А, В и Д, клеток достаточно, они хорошо распластаны, характер роста немного отличается, отражая разницу в строении клеточных подложек (в частности, на маточном ВКМ (рис. 7 В) особенно отчетливо видны клетки, выходящие за предел фокуса резкости, распространяющиеся вглубь субстрата).

Перспективы и практические выводы

Разработанная нами методика срезов может быть использована в качестве удобной альтернативы прецизионных срезов тканей, широко практикующихся в областях фармакологии и токсикологии, а также как субстраты для тканеспецифической 3D культуры клеток. До настоящего времени в таком качестве они не применялись – единственным аналогом предложенной методики может считаться работа [3], в которой внеклеточные матриксы, полученные из участков почек макак-резус, диаметром 8 мм и толщиной 5 мм использовались для изучения сравнения эффективности способов децеллюляризации почечных ВКМ для их последующей рецеллюляризации.

Тканеспецифичные ВКМ человека представляют собой удобные *in vitro* модели для комплексных исследований иммунологических свойств, культивирования и дифференцировки культур стволовых клеток из разных источников в стандартизированных экспериментальных условиях. Трехмерные культуры на основе тканеспецифичных ВКМ позволяют культивировать клетки в условиях, максимально приближенных к таковым *in vivo*, используя стандартные культуральные методы.

При помощи данной методики можно изготавливать стерильные срезы ВКМ практически любых органов и тканей в культуральных планшетах с последующей лиофилизацией способом, предотвращающим повреждение функционально значимых гликопротеидов и мукополисахаридов при вакуумной сушке.

Наряду с этим в процессе получения и манипуляций со срезами ВКМ были сделаны выводы, с учетом которых можно будет оптимизировать дальнейшую работу с ними.

1. Отмывание матки с яичниками от крови лучше всего проводить до извлечения, канюлируя брюшную аорту (в крайнем случае – внутренние подвздошные артерии, причем до извлечения органа), предварительно перевязав все артерии, кроме маточных и яичниковых.

2. Давление перфузии не следует увеличивать более 100–110 мм рт. ст.

3. Нужно выделять яичниковые артерии, яичники децеллюляризовать отдельно.

4. Маточные трубы следует отсекают ближе к основанию, культю перевязывать.

5. Для изготовления качественных срезов материал перед вырезанием тканевого цилиндра с помощью циркулярной фрезы необходимо подвергать более глубокому замораживанию, желательнее жидким азотом (–18°C недостаточно).

6. При перекручивании/сжимании матриксного лоскута (среза) планшет при смене среды следует поместить на орбитальный шейкер (10–15 минут, 70–120 об/мин), в результате чего лоскут расправится.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.А.Д., Б.Е.Л., С.В.П., А.Ю.П., Р.А.П., Н.А.П., Г.Т.С., А.Н.Ш.

Сбор и обработка материала – А.В.В., Б.Е.Л., А.Ю.П., Н.А.П., С.Г.П., Е.А.Р., И.В.С., А.С.С., А.Н.Ш.

Статистическая обработка данных – Г.А.Д., Р.А.П.

Написание текста – Г.А.Д., Б.Е.Л., А.Ю.П., Р.А.П., Г.Т.С.

Редактирование – Г.А.Д., Б.Е.Л., С.В.П., Р.А.П., А.Ю.П., Н.А.П., И.И.С., Г.Т.С., А.Н.Ш.

Литература/References

1. *Rojkind LM, Gattaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid LM.* Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol.* 1980;87(1):255–63. doi: 10.1083/jcb.87.1.255
2. *Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C.* Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. *Cryobiology.* 2000;41(2):135–44. doi: 10.1006/cryo.2000.2275.
3. *Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF.* Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue engineering. Part A,* 2010;16(7):2207–16. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0602
4. *Przygodzka E, Lopinska M, Ziecik AJ.* Precision-cut luteal slices: a promising approach for studying luteal function in pigs. *Reprod Biol.* 2014;14(3):243–7. doi: 10.1016/j.repbio.2014.04.001. Epub 2014 Apr 18.
5. *Lyons-Cohen MR, Nakano H, Thomas SY, Cook DN.* Imaging Precision-Cut Lung Slices to Visualize Leukocyte Localization and Trafficking. *Methods Mol Biol.* 2018;1799:237–46. doi: 10.1007/978-1-4939-7896-0_18.
6. *Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J et al.* Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(4):457–62.

7. *Langer R.* Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21(32–33):3235–6. doi: 10.1002/adma.200902589.
8. *Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233–43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
9. *Pulver A, Shevtsov A, Leybovich B, Artyuhov I, Maleev Y, Peregudov A.* Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants. *Cryo letters.* 2014;35(5):400–6.
10. *Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE.* Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue engineering. Part C, Methods.* 2010;16(2):173–84. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0120.
11. *Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G et al.* A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* 2006;124(6):1283–98. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.040.

Информация об авторах/Author information

Александр Юрьевич Пульвер – генеральный директор, заведующий лабораторией НПК ООО «Институт биологии старения». Alexander Yu. Pulver – General Director, Head of the Laboratory, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-6673-1859>.

Борис Ефимович Лейбович – патологоанатом, гистолог, НПК ООО «Институт биологии старения». Boris Ye. Leibovich – pathologist, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0003-2259-7656>.

Римма Алексеевна Полтавцева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Rimma A. Poltavtseva – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0001-8625-9205>.

Галина Анатольевна Давыдова – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Galina A. Davydova – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher, Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS. <https://orcid.org/0000-0003-4215-7084>.

Артем Николаевич Шевцов – старший научный сотрудник НПК ООО «Институт биологии старения». Artyom N. Shevtsov – Senior Researcher, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-8641-2847>.

Ирина Ивановна Селезнева – кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН; младший научный сотрудник НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Irina I. Selezneva – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Head of the Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS; Junior Researcher, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0003-0316-9883>.

Станислав Владиславович Павлович – кандидат медицинских наук, ученый секретарь НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Stanislav V. Pavlovich – Candidate of Medical Sciences, Scientific Secretary, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0002-1313-7079>.

Наталья Александровна Пульвер – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Natalya Aleksandrovna Pulver – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging», Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4549-54764>.

Екатерина Александровна Раскина – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Ekaterina A. Raskina – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-2195-4116>.

Алексей Владимирович Волков – ассистент, виварийный работник, НПК ООО «Институт биологии старения». Alexey V. Volkov – Assistant, Vivarium Technician, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-1030-5073>.

Артем Сергеевич Сундеев – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Artyom S. Sundeev – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-3846-2046>.

Сергей Геннадьевич Путилин – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Sergey G. Putilin – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-7104-2599>.

Ирина Викторовна Савинцева – научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Irina V. Savintseva – Researcher, Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS.
<https://orcid.org/0000-0002-4162-0375>.

Геннадий Тихонович Сухих – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Gennady T. Sukhikh – Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the NMRC OGP named after V.I. Kulakov.
<https://orcid.org/0000-0002-7712-1260>.

Анна Георгиевна Бабаева (к 90-летию со дня рождения)

15 апреля исполнилось 90 лет Анне Георгиевне Бабаевой, выдающемуся российскому ученому, доктору медицинских наук, профессору, Заслуженному деятелю науки Российской Федерации, академику РАЕН, создателю нового направления морфологии — иммунологии репаративных процессов.

Анна Георгиевна Бабаева родилась 15 апреля 1929 года в Тифлисе (Тбилиси). В 1947 году она закончила школу с золотой медалью и поступила во Второй Московский государственный медицинский институт (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова). После окончания института с отличием в 1953 году Анна Георгиевна поступила в аспирантуру Института экспериментальной биологии в лабораторию роста и развития, основанную в 1949 году под руководством Марии Александровны Воронцовой. За время работы А.Г. Бабаева занимала должности аспиранта, младшего научного сотрудника, старшего научного сотрудника лаборатории роста и развития реорганизованного Института экспериментальной биологии АМН СССР, старшего научного сотрудника этой же лаборатории, переведенной сначала в Институт медицинской генетики АМН СССР, а затем с 1971 года – в НИИ морфологии человека АМН СССР. С 1979 по 2010 год она заведовала лабораторией роста и развития, с 2010 по 2017 год была ведущим научным сотрудником лаборатории.

В 1957 году Анна Георгиевна защитила кандидатскую диссертацию, посвященную морфофизиологическому анализу репаративной регенерации окологлазной слюнной железы морской свинки, а в 1970-м – докторскую диссертацию на тему «Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов». Все эти годы А.Г. Бабаева занималась разными аспектами регенерации внутренних органов у млекопитающих и регуляцией восстановительных процессов (регенерации и компенсаторной гипертрофии). Анна Георгиевна изучала роль функции в инициации репаративной регенерации, характер морфологической перестройки в печени, почке, поджелудочной и слюнных железах при их восстановлении в фило- и онтогенезе, роль иммунной системы в регуляции регенерации и компенсаторной гипертрофии органов. В соавторстве с другими исследователями А.Г. Бабаевой были открыты морфогенетическая функция лимфоцитов, заключающаяся в регуляции пролиферации клеток нелимфоидных органов (открытие № 254, 1981), ранее неизвестный для работы иммунной системы принцип отрицательной обратной связи, проявляющийся в усилении способности лимфоцитов оперированных животных к анти-



телообразованию на введенный антиген в условиях дефицита и полного отсутствия ткани органа, подвергшегося операции (открытие № 39, 1996), способность лимфоцитов переносить регенерационную информацию, определять характер дифференцировки клеток регенерирующего органа, реализовывать генетически запрограммированный регенерационный эффект (открытие № 148, 2000). Наряду с этим ею открыты явление сопряженного и однонаправленного изменения цитогенетической и иммунологической активности лимфоцитов при восстановительных процессах (открытие № 133, 2000) и свойство Т-лимфоцитов млекопитающих предопределять и обеспечивать оперативное перепрограммирование нормального гистогенеза ткани на его резервный вариант при воздействии на организм патогенного фактора (открытие № 278, 2004), а также свойство суммарной рибонуклеиновой кислоты (РНК) лимфоидных и стволовых клеток воспроизводить у аллогенных и ксеногенных реципиентов специфические морфогенезы (открытие № 493, 2016). В соавторстве с другими исследователями установлено закономерное увеличение соотношения в селезенке в первые часы после резекции или полного удаления ткани органа лимфоцитов со свойствами и антигенными маркерами Т-хелперов и Т-супрессоров, разное свойство этих субпопуляций лимфоцитов в регуляции пролиферации клеток иного гистотипа, в запуске и остановке их деления, наличие тесных контактов лимфоцитов с эпителием регенерирующего органа и выработку ими неких гуморальных факторов, влияющих на пролиферацию клеток так же, как и лимфоциты.

Анной Георгиевной Бабаевой обобщены данные о морфогенетических свойствах Т-лимфоцитов, роли суммарной РНК лимфоцитов селезенки в регуляции морфогенетических процессов, ее радиопротекторных и гемопоэтических свойствах, а также о влиянии суммарной РНК лимфоцитов и стволовых клеток на эритропоэз и морфогенетические процессы в предстательной и поджелудочной железах.

В 1997 году А.Г. Бабаевой присвоено почетное звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации. Она является дважды лауреатом Московского общества испытателей природы (1975, 1985) и лауреатом Российской академии естественных наук (2003). Награждена серебряными медалями Российской академии естественных наук: «За развитие медицины и здравоохранения» (медаль имени И.П. Павлова), серебряной памятной медалью, посвященной лауреату Нобелевской премии П.Л. Капице, почетной медалью «За практический вклад в укрепление здоровья нации» (медаль имени И.И. Мечникова), а также серебряными медалями имени П. Эрлиха (2002) и имени Р. Вирхова (2003) (ФРГ).

А.Г. Бабаева является автором более 200 работ, в том числе 14 монографий и семи коллективных монографий – руководств, одно из которых переведено за рубежом. Основные монографии: «Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов» (1972), «Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез» (1979), «Регенерация и система иммуногенеза» (1985), «Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений» (1987), «Регенерационные процессы и их изучение в СССР» (1990), «Двуликий Янус организма» (2001), «Путешествие в трансфизиологию» (2002), «Тромбоциты и антитром-

боцитарные антитела» (2003), «Клеточный химеризм и химеризм клетки при трансплантации костного мозга» (2003), «Регенерация» (2009), «Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей» (2009), «О рекапитуляции при регенерации и заболеваниях» (2013), «О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах» (2016).

Анной Георгиевной Бабаевой подготовлено 16 кандидатов и докторов наук.

Наряду с научной деятельностью А.Г. Бабаева вела активную общественную работу. На протяжении ряда лет она была председателем секции гистологии, эмбриологии и цитологии Московского общества испытателей природы (1981–1990), академиком-секретарем отделения РАЕН «Нормальная физиология и морфология» (1994–2004).

Анна Георгиевна увлекается музыкой, искусством, пишет повести и сказки. В настоящее время продолжает научную работу.

Коллектив Научно-исследовательского института морфологии человека и редакционная коллегия журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» от всей души желают Анне Георгиевне Бабаевой крепкого здоровья, продолжения творческого поиска, новых произведений, насыщенных талантом и энергией!

Вячеслав Семенович Пауков (к 85-летию со дня рождения)

Вячеслав Семенович Пауков – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАЕН, действительный член Международной академии патологии, почетный заведующий кафедрой патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Автор более 370 научных работ, в том числе 29 монографий, учебников, различных учебных пособий.

В.С. Пауков родился 25 июня 1934 года. В 1960 году он окончил лечебный факультет Второго Московского государственного медицинского института им. Н.И. Пирогова. После окончания института был направлен на работу в Центральную клиническую рентгено-радиологическую больницу Министерства путей сообщения в качестве хирурга. В 1962 году Вячеслав Семенович сменил род деятельности и перешел на работу сначала в Московское городское бюро судебно-медицинской экспертизы, а затем в Центральную судебно-медицинскую лабораторию Министерства обороны в качестве врача-эксперта. В этот период Вячеслав Семенович Пауков получил большой жизненный и профессиональный опыт, постоянно выезжая на различные происшествия, участвуя в судах в качестве эксперта, и, конечно, обогатился большим опытом прозекторской практики. Работая в военной судебной медицине, он начал заниматься научными исследованиями под руководством члена-корреспондента АМН профессора М.И. Авдеева – ученика А.И. Абрикосова. М.И. Авдеев предложил В.С. Паукову изучить проблему субарахноидальных кровоизлияний, часто встречающихся в судебно-медицинской практике, причина которых тем не менее была не так проста. М.И. Авдеев считал, что эти кровоизлияния являются не результатом травмы, а возникают из-за врожденного порока сосудов – аневризмы одной из артерий головного мозга. Исследования В.С. Паукова в принципе не противоречили этой концепции, однако возникли вопросы, что же происходит со стенкой сосуда и какими методами ее изучать. Чтобы понять это, В.С. Пауков начал посещать заседания Московского общества патологоанатомов, читать соответствующую патологоанатомическую литературу и понял, что на современном этапе развития науки нельзя однозначно ответить, почему возникает аневризма артерии мозга и имеется ли прямая связь между незначительной травмой и массивным субарахноидальным кровоизлиянием. Однако М.И. Авдеев не соглашался на изменение темы научного исследования, а тот половинчатый результат, который получил



В.С. Пауков, не мог стать темой диссертации, которую он хотел написать.

В это время, посещая заседания Московского общества патологоанатомов, В.С. Пауков познакомился с выдающимся ученым – академиком А.И. Струковым, который заведовал кафедрой патологической анатомии Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. На кафедре только что появился примитивный настольный электронный микроскоп, и В.С. Пауков, посмотрев в него, был зачарован ультраструктурой клетки. А.И. Струков предложил ему поступить в аспирантуру кафедры и заняться новым методом исследования – электронной микроскопией. Предложение оказалось судьбоносным для В.С. Паукова. В 1964 году он стал аспирантом кафедры патологической анатомии Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова, с которым не расстается до сегодняшнего дня. Здесь он начал изучать гипертрофию миокарда у пациентов и в эксперименте. В это время А.И. Струков обосновал основополагающий принцип патологии о единстве структуры и функции, который был глубоко воспринят Вячеславом Семеновичем, неуклонно следовавшим этому принципу, работая совместно с клиницистами и патофизиологами. В 1968 году В.С. Пауков защитил кандидатскую диссертацию, посвященную ультраструктуре гипертрофии миокарда. В ней он показал, что в основе как патологических, так и компенсаторно-приспособительных процессов в сердце лежит изменение биоэнергетики как основополагающего принципа биологии. С 1967 года В.С. Пауков стал ассистентом кафедры, возглавлявшейся А.И. Струковым. Владение методом электронной микроскопии позволило ему вместе с профессором В.В. Серовым издать первый в стране атлас «Ультраструктурная патология», который позже стал составной частью атласа В.В. Серова, Н.Е. Ярыгина и В.С. Паукова «Патологическая анатомия».

В 1968 году академик А.И. Струков, которого хорошо знали патологи Европы и Америки, договорился

с одним из ведущих патологов Европы профессором В. Дёрром о стажировке В.С. Паукова в его Институте патологии в Гейдельберге (Федеративная Республика Германия). Вячеслав Семенович Пауков стал первым советским врачом, который в течение полугода стажировался в Гейдельбергском университете, изучая электронную автордиографию. Позже, в 1992 году, он работал в Бонне, где изучал проблемы перитонита в Институте патологии университета.

В 1972 году В.С. Пауков стал доцентом кафедры, а в 1977-м защитил докторскую диссертацию на тему «Ультроструктурные основы патологии сердца», по материалам которой в 1982 году вместе с патофизиологом В.А. Фроловым издал монографию «Элементы теории патологии сердца». В 1978 году В.С. Пауков стал профессором кафедры патологической анатомии. В это время в Первом Московском медицинском институте им. И.М. Сеченова было два лечебных факультета, один из которых преобразовали из вечернего факультета, функционировавшего на базе городских больниц. Городская больница № 7 стала клиникой института, в ней было открыто несколько кафедр, в том числе создана новая кафедра патологической анатомии 2-го лечебного факультета. Заведующим этой кафедрой ученый совет института весной 1980 года избрал профессора В.С. Паукова. Вячеславу Семеновичу удалось создать сплоченный, работоспособный молодой коллектив единомышленников, которые пользовались уважением у персонала больницы, интенсивно и плодотворно занимались наукой, в частности проблемами воспаления. Сотрудники кафедры защитили девять кандидатских и пять докторских диссертаций, издали несколько монографий.

В этот период Первый Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова тесно сотрудничал со здравоохранением Тульской области. На базе Тульской областной больницы был открыт филиал лечебного факультета 1-го ММИ им. И.М. Сеченова, на кафедрах института выполняли кандидатские и докторские исследования сотрудники областной больницы. В 1993 году в Тульском политехническом институте открылся свой медицинский факультет, который возглавил профессор А.А. Ходарцев. Факультету надо было помочь в становлении, и эту помощь, разумеется, оказал 1-й ММИ им. И.М. Сеченова. Особенно близки интересы тульского здравоохранения были кафедре патологической анатомии 2-го лечебного факультета, так как на кафедре работал туляк по рождению и началу профессиональной деятельности Герой Социалистического труда, Заслуженный деятель науки, академик АМН и многих зарубежных академий профессор А.И. Струков. Так, на кафедре патологической анатомии выполнили и защитили диссертации туляки А. Гусейнов, Ю.А. Ерохин, Б.Б. Бантыш.

В 1993 году на кафедру Тульского политехнического института приехал талантливый организатор, заместитель декана факультета С.Т. Лашнев. Он попро-

сил В.С. Паукова помочь в организации преподавания патологической анатомии на факультете, опираясь на опыт московской школы патологоанатомов. В.С. Пауков согласился, и за три года благодаря его поддержке медицинский факультет Тульского университета стал кузницей полноценного медицинского образования и приобрел авторитет не только в России, но и за рубежом. Позднее В.С. Пауков приезжал в Тулу в составе государственной экзаменационной комиссии. Работа В.С. Паукова в Туле отмечена Почетной грамотой губернатора Тульской области.

В 1998 году в 1-м ММИ им. И.М. Сеченова (тогда уже 1-я Московская медицинская академия) был ликвидирован 2-й лечебный факультет, и В.С. Пауков начал работать в качестве профессора на кафедре патологической анатомии, которую возглавлял ректор академии М.А. Пальцев.

В 2000-е годы по предложению юристов В.С. Пауков, используя свой опыт судебно-медицинской работы, преподавал судебную медицину и судебную психиатрию в Московской академии экономики и права. В этот период им были изданы учебники «Судебная медицина и судебная психиатрия» (совместно с Ю.И. Пиголкиным), а также «Лекции по судебной медицине» и «Лекции по судебной психиатрии». За помощь в преподавании этих дисциплин в юридических вузах В.С. Пауков избран почетным профессором Московской академии экономики и права и награжден Золотой медалью Н.Н. Моисеева «За заслуги в образовании и науке», присуждаемой лучшим лекторам негосударственных вузов.

В 2010 году ученый совет Первого МГМУ им. И.М. Сеченова избрал В.С. Паукова заведующим кафедрой патологической анатомии, и на этой должности он трудился до 2017 года. Учитывая свой возраст и предстоящие по его предложению преобразования на кафедре, Вячеслав Семенович рекомендовал на звание заведующего кафедрой профессора Е.А. Коган, а сам, получив звание почетного заведующего кафедрой, продолжает трудиться в качестве ее профессора.

В течение всех 55 лет работы на кафедре В.С. Пауков работает над написанием и изданием разных учебников и учебных пособий. В период работы на кафедре патологической анатомии лечебного факультета под совместной редакцией с М.А. Пальцевым им был подготовлен и издан двухтомный учебник для вузов «Патология», в котором В.С. Пауковым написаны девять глав. Кроме того, было издано руководство для врачей «Патология». В период заведования кафедрой под редакцией В.С. Паукова и при его авторском участии изданы новый двухтомный учебник «Патологическая анатомия», который был переиздан, «Практикум по патологической анатомии», три тома тестов по патологической анатомии, в 2018 году вышло в свет руководство для врачей «Клиническая патология». Наряду с этим много лет В.С. Пауков пишет учебники для медицинских колледжей. В последнее десятилетие им

написан учебник для медсестер «Основы патологии», совместно с патофизиологом профессором П.Ф. Литвицким изданы учебники для медицинских колледжей «Патологическая анатомия и патологическая физиология», «Основы клинической патологии».

В.С. Пауков постоянно ведет научную работу, результаты которой публикуются в монографиях и научных статьях. Он выполнил оригинальные исследования по пато- и морфогенезу хронического воспаления, и результаты этой работы отражены в руководстве для врачей «Воспаление». Долгие годы Вячеслав Семенович изучает патологическую анатомию алкогольной интоксикации, в результате чего была предложена оригинальная концепция алкогольной болезни, показавшая, что усилия медицины могут оказаться эффективными только при лечении пьянства как стадии хронической алкогольной интоксикации, но не алкоголизма. Совместно с профессором Б.Б. Салтыковым издана монография «Диабетическая микроангиопатия», совместно с А.С. Гавришем опубликована монография «Ишемическая кардиомиопатия», совместно с Е.А. Коган и другими авторами – атлас «Патология органов дыхания», совместно с В.В. Серовым – атлас «Патологическая анатомия».

Много сил отдал профессор В.С. Пауков работе в экспертном совете ВАК, членом которого был в течение 35 лет. Он член ученого совета университета, заместитель председателя диссертационного совета, был членом редколлегии журнала «Архив патологии» и является членом редколлегии журнала «Клиническая и экспериментальная морфология». Наряду с этим В.С. Пауков – председатель совета старейших Российского общества патологоанатомов, а также председа-

тель совета старейшин Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, в свое время возглавлял Московское общество патологоанатомов и входил в президиум Всесоюзного общества патологоанатомов.

Вячеслав Семенович Пауков награжден девятью правительственными наградами, в том числе тремя орденами, имеет ряд научных наград, он Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАЕН и Международной академии патологии, каждая из которых наградила его своими медалями.

Весь жизненный и профессиональный путь Вячеслава Семеновича является образцом для подражания молодого поколения. Будучи крупным ученым, великолепным лектором и оратором, занимая руководящие должности, Вячеслав Семенович лишен чванства, всегда был и остается очень обаятельным, остроумным, интересным, доступным собеседником и высокоморальным человеком. Ему чужд конформизм, он всегда готов отстаивать нравственные позиции, не страшась идти наперекор обстоятельствам. Его энергия и оптимизм заряжают окружающих. Многие люди благодарны поддержке, оказанной им Вячеславом Семеновичем в трудных ситуациях.

Поздравляем дорогого Вячеслава Семеновича с юбилеем, желаем ему крепкого здоровья, жизнелюбия, оптимизма, новых творческих свершений и радости жизни!

*Российское общество патологоанатомов,
редакционная коллегия журнала
«Клиническая и экспериментальная морфология»,
коллектив соратников*

ХІ пленум Российского общества патологоанатомов

31 мая – 1 июня 2019 года в Самаре прошел ХІ пленум Российского общества патологоанатомов, посвященный вопросам клинических, патологоанатомических и юридических аспектов ятрогений, врачебных ошибок и расхождений диагнозов. В работе пленума приняли участие более 200 специалистов из разных регионов России. Наряду с патологоанатомами в обсуждении участвовали судебно-медицинские эксперты, юристы, представители следственного комитета, страховых организаций и организаторы здравоохранения.

Пленум отметил, что клиничко-анатомические сопоставления являются важным элементом контроля качества лечебно-диагностической работы, их роль неопределима в обеспечении качества лечебной, диагностической и образовательной работы и выявлении дефектов оказания медицинской помощи. Кроме того, на пленуме было отмечено, что необходимо повысить роль клиничко-патологоанатомических конференций, восстановив их официальный статус в нормативных документах Минздрава России. Серьезный тормоз в клиничко-анатомических сопоставлениях – штрафные санкции со стороны Фонда обязательного медицинского страхования за расхождения посмертного клиничко-патологоанатомического диагнозов. ХІ пленум Российского общества патологоанатомов решительно осудил подобную практику и выступил за отмену действующих штрафных санкций.

Был рассмотрен вопрос о роли патологоанатомов в оценке категорий расхождения клиничко-патологоанатомического диагнозов. Штрафные санкции за расхождения диагнозов 2-й и 3-й категорий привели к тому, что процент расхождений этих категорий стал резко падать, причем 3-я категория расхождений свелась практически к нулю. В то же время процент расхождений 1-й категории, не облагаемых штрафами, резко увеличился. В связи с этим обострился вопрос о роли патологоанатомов в квалификации категорий

расхождения. Пленум постановил, что вопрос о квалификации категорий расхождения должен решаться строго коллегиально в клиничко-экспертных комиссиях, (под)комиссиях по изучению летальных исходов, на клиничко-анатомических конференциях, на патологоанатомов же возлагается только установление факта расхождения диагнозов. В вопросах оценки категорий расхождений диагнозов рекомендовано применять используемые в большинстве стран международные правила сопоставления (сличения) диагнозов по системе (или критериям) Гольдмана.

В связи с проблемами клиничко-анатомических сопоставлений и формулировки диагноза обсуждался вопрос о передаче функций кодирования заболеваний от патологоанатомов полностью в руки службы медицинской статистики, учитывая в этом отношении опыт высокоразвитых стран.

Пленум однозначно определил позицию Российского общества патологоанатомов в отношении врачебных ошибок. Врачебная ошибка в настоящее время не име-





ет, к сожалению, должного официального правового статуса, трактуется неоднозначно. В соответствии с традициями отечественной медицины врачебную ошибку следует рассматривать как добросовестное заблуждение врача по объективным или субъективным причинам без умысла причинения вреда пациенту. Пленум считает неправомерным отнесение врачебных ошибок к категории должностных правонарушений, требующих административного или уголовного преследования. Врачебные ошибки следует четко отличать от должностных правонарушений, халатности и других противоправных действий медицинских работников. Для урегулирования этих вопросов существует настоятельная потребность разработать и официально



узаконить юридическое определение врачебных ошибок. Отождествление врачебных ошибок и ятрогений ошибочно. Ятрогении подразумевают неблагоприятные последствия действий (или бездействий) медицинских работников и не всегда связаны с врачебными ошибками. Определенная часть ятрогений, в отличие от врачебных ошибок, может быть отнесена к категории медицинских правонарушений.

Л.В. Кактурский, президент Российского общества патологоанатомов, член-корреспондент РАН
А.И. Щеголев, генеральный секретарь Российского общества патологоанатомов, профессор

Требования к рукописям, направляемым в журнал «Клиническая и экспериментальная морфология»

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

Общие правила

Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала с полями 2,5 см с каждой стороны. Выравнивание по ширине без переносов; абзацный отступ – 1,25 см.

Рукопись статьи должна сопровождаться скан-копиями заявления (подписанного руководителем и заверенного печатью учреждения) и контрольного листа (формы представлены на сайте журнала cem-journal.ru).

Рукописи, а также сопроводительные документы могут быть направлены в редакцию по электронной почте на адрес журнала cem.journal@mail.ru или через сайт cem-journal.ru (текст статьи подается в формате Microsoft Word, сопроводительные документы с оригинальными подписями прикрепляются к письму в формате PDF).

Статья регистрируется в редакции только при наличии полного комплекта документов.

Структура рукописи

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

Формат заглавия: название работы – с прописной, далее строчными буквами; инициалы, фамилия авторов – курсивом, полное название организации с ведомственной принадлежностью, город, страна – Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала строчными буквами.

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

Авторский реферат (аннотация)

Перед началом текста статьи печатаются аннотация (реферат) **объемом 200–250 слов**, в котором отражается основное содержание работы, и ключевые слова (от

трех до семи). Реферат должен излагать основные и существенные факты работы. Для оригинальных исследований резюме должно быть структурированным в соответствии с текстом статьи и включать разделы **Введение, Цель исследования, Методы, Результаты, Заключение (Выводы)**. Сокращения и условные обозначения, кроме общеупотребительных, применяют в исключительных случаях, им дают расшифровку и определения при первом упоминании в тексте (не в резюме). Ключевые слова должны быть максимально конкретными и отражать специфику статьи.

После ключевых слов следуют разделы:

Для корреспонденции. Указываются полностью имя, отчество фамилия, автора, ответственного за связь с редакцией, E-mail.

Для цитирования. Инициалы, фамилии авторов. Название статьи. Клиническая экспериментальная морфология.

Финансирование. Варианты:

- Исследование выполнено в рамках государственного задания, далее – наименование учреждения с ведомственной принадлежностью, номер государственного учета НИР.
- Работа выполнена при финансовой поддержке гранта (наименование фонда, номер гранта).

Конфликт интересов.

Corresponding author.

For citation. Authors. Title. Clin. exp. morphology **Funding.**

- The work (the resaerch) was performed within the framework of the state assignment of ... (Institution) (No. ...).
- This work was supported by the (Institution: e.g. Russian Science Foundation (RSF) / Russian Basic Research Foundation (RFBR)) grant (No. ...).

Conflict of interest.

Титульный лист должен быть представлен на русском и английском языках.

Образец титульной страницы

УДК: 619:616-001.4

Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих

Т.В. Шмакова¹, Е.Ю. Кананыхина^{1,2}, Г.Б. Большакова¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Текст резюме, ключевые слова

Для корреспонденции: Татьяна Владимировна Шмакова. E-mail: tanesta12@gmail.com

Для цитирования: Т.В. Шмакова, Е.Ю. Кананыхина, Г.Б. Большакова. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих. Клин. эксп. морфология.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (№ ААА-А17-117013050044-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals

T.V. Shmakova¹, E.Yu. Kananykhina^{1,2}, G.B. Bolshakova¹

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract text, key words

Corresponding author: Tatyana V. Shmakova, E-mail:tanesta12@gmail.com

For citation: T.V. Shmakova, E.Yu. Kananykhina, G.B. Bolshakova. Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals. Clin. exp. morphology

Funding. The work in done in the framework of the state assignment of FSBI Research Institute of Human Morphology (No ААА-А17-117013050044-8).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

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

В тексте оригинальной статьи **обязательно** должны быть выделены следующие разделы: **Введение; Цель исследования; Материалы и методы; Результаты; Обсуждение** (возможно объединение разделов – **Результаты и обсуждение**); **Выводы** (или **Заключение**); **Вклад авторов; Литература/References; Информация об авторах/Author information.**

В разделе «Вклад авторов» (в конце текста статьи) следует указывать только инициалы и первую букву фамилии.

Образец

Концепция и дизайн исследования – Г.Б.Б.
Сбор и обработка материала – Т.В.Ш., Е.Ю.К.
Написание текста – Т.В.Ш., Е.Ю.К.
Редактирование – Г.Б.Б.

В разделе **Информация об авторах/Author information**, который должен быть расположен после списка литературы и представлен на русском и английском языках, указываются **полностью** имя, отчество, фамилия авторов, ученая степень, ученое звание, должность, структурное подразделение, учреждение (сокращенное наименование с официального сайта), ORCID.

Образец

Татьяна Владимировна Шмакова – младший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.

Tat'yana V. Shmakova – Junior Researcher of Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-5722-5417>.

Евгения Юрьевна Кананыхина – младший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦ АГиП им. акад. В.И. Кулакова.

Evgeniya Yu. Kananykhina – Junior Researcher of Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia, Junior Researcher of Laboratory Regenerative Medicine, V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-9779-2918>.

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

Galina B. Bol'shakova – Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Growth and Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-9669-0821>

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

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

Кроме общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК) допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте (не более 4–5 аббревиатур). Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте (не в резюме) при их

первом упоминании. Сокращения простых слов, даже если они часто повторяются, не допускаются. Единицы измерения даются по системе СИ. Курсивом указывают названия микроорганизмов, генотипов и аллелей генов.

Использование сокращений в выводах или заключении не допускается.

Иллюстрации. Рисунки должны быть четкими, фотографии – контрастными. На каждый рисунок необходимо сделать ссылку в статье. *Подрисовочные подписи даются отдельно с указанием номера рисунка и объяснением условных обозначений на русском и английском языках.* В подписях к микрофотографиям нужно указывать метод окрашивания (визуализации), степень увеличения или размер масштабной линейки.

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

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

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

Библиография и образцы оформления литературы

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

В оригинальных статьях цитируется не более 15–20 источников, в обзорах – не более 50. Ссылки на публикации авторов статьи (самоцитирование) не должны составлять более 15 процентов от общего списка. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Журнал использует Ванкуверский стиль цитирования источников: <https://rasedp.ru/images/materials/vancouver.pdf>

Библиографические источники должны быть расположены в порядке цитирования в тексте и пронумерованы. В тексте статьи библиографические ссылки даются в квадратных скобках арабскими цифрами в соответствии со списком литературы. Список литературы должен быть озаглавлен **Литература/References**, напечатан на отдельном листе через 1,5 интервала, каждый

источник с новой строки под порядковым номером; с указанием DOI (при наличии). Фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции.

В отечественных и зарубежных публикациях при авторском коллективе книги или статьи до шести человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах — шесть первых авторов и «др.» или «et al.».

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

Образцы оформления литературы

Статья в журнале

Прошина А.Е. Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;2:4–11 [*Proshchina A.E.* Plasticity of the endocrine part of human pancreas. Clin. exp. morphology. 2017; 2: 4–11. (In Russ.)].

Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Боcharов Е.В. и др. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriatal дофаминергической системы у мышей. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010;96(3): 270–282 [*Kozina E.A., Khaindrava V.G., Kudrin V.S., Kucheryanu V.G., Klodt P.D., Bocharov E.V. et al.* Experimental modeling of functional deficiency of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. 2010;96(3):270–282. (In Russ.)].

Gerosa M, Visca A, Rizzo P, Foroni R, Nicolato A, Bricolo A. Glomusjugulare tumors: The option of gamma knife radiosurgery. Neurosurgery. 2006;59:561–569.

Petrie KJ, Muller JT, Schirmbeck F, Donkin L, Broadbent E, Ellis CJ, et al. Effect of providing information about normal test results on patients' reassurance: randomised controlled trial. British Medical Journal. 2007;334(7589):352–354. doi:10.1136/ bmj.39093.464190.55.

Книга печатная

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

Воробьев А.П. (ред.). Руководство по гематологии. 3-е изд. М.: Ньюдиамед, 2005. [Vorobyov A.P., ed. Man-

ual on hematology. 3rd ed. Moscow: Nyudiamed, 2005. (In Russ.)].

An YH., Kylie LM. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Totowa, NJ: Humana Press, 2003.

Книга электронная (доступна онлайн)

Греч Е.Д. Азбука интервенционной кардиологии. 2-е изд. Чичестер: Уайли Блэквелл; 2011. Доступно по адресу: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/imperial/detail.action?docID=822522> (Получено 6 июля 2017).

Grech ED. ABC of interventional cardiology. 2nd ed. Chichester: Wiley blackwell; 2011. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/imperial/detail.action?docID=822522> (Accessed 6th July 2017).

Глава в книге, статья в сборнике

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

Silver RM, Peltier MR, Branch DW. The immunology of pregnancy. In: Creasey RK, Resnik R (eds.) Maternal-fetal medicine: Principles and practices. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. P. 89–109.

Иванова А.Е. Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: В.Г. Осипов, Л.Л. Рыбаковский (ред.). Демографическое развитие России в XXI веке. М.: Экон-Информ, 2009. С. 110–131. [*Ivanova A.E.* Trends and causes of death of the population of Russia. In: Osipov V.G., Rybakovsky L.L. (eds.). Demographic development of Russia in the XXI century. Moscow: Ekon-Inform. 2009. S. 110–131 (In Russ.)].

Редакторы, составители в качестве авторов

Крыжановский Г.Н. Пластичность. В кн.: Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов. Под ред. Г.Н. Крыжановского. М.: Медицина, 2002. [Kryzhanovsky G.N. (ed.). Plasticity. In: Disregulation pathology: A guide for physicians and biologists. Kryzhanovsky G.N. (ed.). Dizregulyatsionnaya patologiya: Rukovodstvo dlya vrachey i biologov. Moscow: Meditsina, 2002 (In Russ.)].

Mikhelson AD (ed.). Platelets. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

Mesiecky J, Lamm ME, Strober W. (eds.). Mucosal immunology. 3rd ed. New York: Academic Press, 2005.

Материалы научных конференций

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

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics.

In: Lun KC, Degoulet P. (eds.). MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World congress on medical informatics. 1992 Sep 6–10; Geneva Switzerland. Amsterdam: North-Holland. 1992; 1561–5.

Диссертации

Levickij AV. Features of distribution, lymphatic metastasis and the results of surgical treatment of patients with early gastric cancer: Avtoref. Cand. Diss. (Med. Sci.). 2009.

Мусина Л.М. Анатомическое обоснование восстановления альвеолярного отростка верхней челюсти соединительнотканными аллотрансплантатами: Автореф. дис. канд. мед. наук. Уфа, 2014 [*Musina L.M.* Anatomical study on the rehabilitation of the alveolar process of the maxilla by connective tissue allografts: Avtoref. Cand. Diss. (Med. Sci.). Ufa, 2014. (In Russ.)].

Множественные публикации. Редакция не рассматривает статьи, ранее опубликованные, одновременно представленные для публикации в другие журналы, а также работы, которые в большей части уже были опубликованы в виде статьи или представлены для публикации (приняты к печати) другим печатным

изданием либо электронными средствами массовой информации. Это не исключает рассмотрение статьи, не принятой к публикации другим журналом, или полного описания, представленного после публикации предварительных результатов, то есть тезисов или постерных сообщений, представленных на профессиональных конференциях.

* * *

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

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

Авторские экземпляры не предусмотрены. Полные тексты статей, размещаются в открытом доступе на сайте **cem-journal.ru**. Печатный вариант журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» можно получить только по подписке.