

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 9 | № 3 | 2020

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

Журнал представлен  
в информационных базах  
данных Russian Science  
Citation Index (RSCI),  
eLIBRARY.ru/РИНЦ (Россия)

Включен в перечень ВАК

## 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: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.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

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

## Заместители главного редактора

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

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

## 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

*Алиев Г.М.*, кандидат мед. наук,  
профессор, Сан-Антонио, США

*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

*Коршунов А.Г.*, доктор мед. наук,  
профессор, Гейдельберг, Германия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Редакционный совет

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

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

*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

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

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

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

*Новочадов В.В.*, доктор мед. наук,  
профессор, Волгоград, Россия

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.  
Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

# CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL  
With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 9 | № 3 | 2020

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

The Journal is indexed in the  
Russian Science Citation Index  
(RSCI), eLIBRARY.ru (Russia)

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

## Journal founder

FSBSI «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

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

© FSBSI «Research Institute of  
Human Morphology»

## 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

*Aliev, Gjumrakch M.*, Cand. Sci. Med.,  
Professor, San Antonio, USA

*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

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

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

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

*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

*Fatkhudinov, Timur Kh.*, Dr. Sci. Med.,  
Associate 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Mishnev, Oleg D.*, Dr. Sci. Med., Professor,  
Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

## Editorial Review Board

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

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

**ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ**  
**REVIEWS**

- |   |    |  |
|---|----|--|
| <p><i>П.В. Никитин, М.В. Рыжова, А.А. Потанов, С.А. Галстян, Д.С. Ким, Т.Н. Панина, С.В. Шугай, Д.В. Старовойтов, Е.А. Хохлова, И.В. Зубова</i><br/>Молекулярная и гистологическая гетерогенность глиобластом</p>               | 5  | <p><i>P.V. Nikitin, M.V. Ryzhova, A.A. Potapov, S.A. Galstyan, D.S. Kim, T.N. Panina, S.V. Shugai, D.V. Starovoitov, E.A. Khokhlova, I.V. Zubova</i><br/>Glioblastoma molecular and histological heterogeneity</p>             |
| <p><i>Г.И. Табеева, М.Р. Думановская, А.В. Асатурова, И.М. Богданова, С.З. Саная, А.В. Трезубова</i><br/>Особенности регуляции и функции инфламмасом при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы</p> | 12 | <p><i>G.I. Tabeeva, M.R. Dumanovskaya, A.V. Asaturova, I.M. Bogdanova, S.Z. Sanaya, A.V. Tregubova</i><br/>Features of regulation and function of inflammasomes in inflammatory diseases of the female reproductive system</p> |
| <p><i>В.Н. Сальков, Р.М. Худерков</i><br/>Изменение содержания меди и цинка в структурах головного мозга при болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера</p>   | 21 | <p><i>V.N. Salkov, R.M. Khudoerkov</i><br/>Copper and zinc level alterations in the brain structures in Parkinson's and Alzheimer's diseases</p>   |

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**  
**ORIGINAL RESEARCHES**

- |  |    |   |
|--|----|---|
| <p><i>Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, Д.А. Отлыга, С.В. Савельев</i><br/>Применение антител к везикулярному транспортеру ацетилхолина и ацетилхолинэстеразе в исследованиях пренатального развития парасимпатической иннервации поджелудочной железы человека</p>          | 27 | <p><i>Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, D.A. Otlyga, S.V. Saveliev</i><br/>Application of antibodies to the vesicular transporter of acetylcholine and acetylcholinesterase in the studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas</p>            |
| <p><i>Л.М. Михалева, А.Г. Коноплянников, Я.Ю. Кудрявцева, Ю.Г. Пархоменко, А.С. Оленев, О.А. Тишкевич, Н.А. Грачева, А.Е. Бирюков, С.А. Михалев, Е.Н. Сонголова</i><br/>Роль экстрагенитальной инфекционной патологии в структуре материнской смертности г. Москвы</p> | 34 | <p><i>L.M. Mikhaleva, A.G. Konoplyannikov, Y.Y. Kudryavtseva, Y.G. Parhomenko, A.S. Olenev, O.A. Tishkevich, N.A. Gracheva, A.E. Biryukov, S.A. Mikhalev, E.N. Songolova</i><br/>The role of extragenital infectious pathology in the structure of maternal mortality in Moscow</p> |
| <p><i>Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко, И.Л. Шливко, О.Е. Гаранина</i><br/>Иммуногистохимические критерии рецидивирования базально-клеточной карциномы нодулярного строения</p>  | 43 | <p><i>N.Yu. Orlinskaya, D.V. Davydenko, I.L. Shlivko, O.E. Garanina</i><br/>Immunohistochemical criteria for recurrent nodular basal cell carcinoma</p>   |

К.А. Артемьева, И.М. Богданова,  
И.И. Степанова, М.Н. Болтовская,  
А.А. Степанов, Е.А. Пономаренко, О.В. Калюжин,  
А.Е. Земляков, С.В. Дамбаева  
Особенности морфофункционального состояния  
маточно-плацентарной единицы  
и эмбриона мыши на ранних сроках  
экспериментального невынашивания  
беременности

50 К.А. Artemyeva, I.M. Bogdanova, I.I. Stepanova,  
M.N. Boltovskaya, A.A. Stepanov, E.A. Ponomarenko,  
O.V. Kalyuzhin, A.E. Zemlyakov, S.V. Dambaeva  
Morphofunctional features of the uteroplacental unit  
and mouse embryo in the early stages of experimental  
miscarriage

Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова,  
К.Р. Горохов, С.В. Савельев  
Иммуногистохимические особенности  
каротидного клубочка человека

61 D.A. Otlyga, O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova,  
K.R. Gorokhov, S.V. Saveliev  
Immunohistochemical features of the human carotid  
body

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

А.С. Конторщикова, А.Л. Черняев,  
О.А. Васюкова, Ж.Р. Омарова  
Хронический гиперсенситивный пневмонит,  
осложненный острой респираторной вирусной  
инфекцией

68 A.S. Kontorshchikov, A.L. Chernyaev,  
O.A. Vasyukova, Zh.R. Omarova  
Hypersensitivity pneumonitis complicated by acute  
respiratory viral infection

## МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

Н.А. Олейникова, О.А. Харлова,  
Н.В. Данилова, И.А. Михайлов, П.Г. Мальков  
Использование левамизола для блокирования  
кишечной формы щелочной фосфатазы  
при проведении иммуногистохимических реакций

74 N.A. Oleynikova, O.A. Kharlova,  
N.V. Danilova, I.A. Mikhailov, P.G. Malkov  
Levamisole usage for the block of intestinal alkaline  
phosphatase in immunohistochemical staining

## ЮБИЛЕИ ANNIVERSARIES

Марина Николаевна Болтовская  
(к 70-летию со дня рождения)

80 Marina Nikolaevna Boltovskaya  
on her 70th birthday

Андрей Львович Черняев  
(к 70-летию со дня рождения)

82 Andrey Lvovich Chernyaev  
on his 70th birthday

## Молекулярная и гистологическая гетерогенность глиобластом

*П.В. Никитин, М.В. Рыжова, А.А. Потапов, С.А. Галстян, Д.С. Ким,  
Т.Н. Панина, С.В. Шугай, Д.В. Старовойтов, Е.А. Хохлова, И.В. Зубова*

Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

Гетерогенность свойств опухолей представляет собой серьезную диагностическую и лечебную проблему. Она проявляется изменчивостью и вариабельностью генетических, протеомных и эпигенетических параметров как между разными образцами одного и того же гистологического варианта опухоли, так и между различными участками с наличием разнородных клеточных популяций в рамках единого новообразования у конкретного пациента. Глиобластома (ГБ) – одна из самых частых смертельных опухолей центральной нервной системы у человека. Вопросы межопухолевой гетерогенности являются ключом к разработке как новых диагностических подходов, так и инновационных персонализированных методов лечения пациентов. В рамках обзора суммированы основные данные о межопухолевой гетерогенности ГБ. Рассматриваются основные генетические, эпигенетические и протеомные аспекты современного понимания молекулярного профиля ГБ и их межопухолевой гетерогенности.

**Ключевые слова:** глиобластома, межопухолевая гетерогенность, генетика глиобластом, мутации

**Для корреспонденции:** Павел Владимирович Никитин. E-mail: [nikitinpaulv@yandex.ru](mailto:nikitinpaulv@yandex.ru)

**Для цитирования:** Никитин П.В., Рыжова М.В., Потапов А.А., Галстян С.А., Ким Д.С., Панина Т.Н., Шугай С.В., Старовойтов Д.В., Хохлова Е.А., Зубова И.В. Молекулярная и гистологическая гетерогенность глиобластом. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):5–11. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.5-11

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

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

Статья поступила 25.03.2020. Получена после рецензирования 29.04.2020. Принята в печать 14.05.2020.

### Glioblastoma molecular and histological heterogeneity

*P.V. Nikitin, M.V. Ryzhova, A.A. Potapov, S.A. Galstyan, D.S. Kim,  
T.N. Panina, S.V. Shugai, D.V. Starovoitov, E.A. Khokhlova, I.V. Zubova*

N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

The heterogeneity of tumors properties is a serious diagnostic and therapeutic problem. It is manifested by the variability of genetic, proteomic and epigenetic parameters both between different samples of the same histological variant of the tumor, and between different sites within the same neoplasm with the presence of heterogeneous cell populations in this particular patient. Glioblastoma (GB) is one of the most frequent fatal tumors of the central nervous system in humans. The understanding the intertumor heterogeneity is the key to the development of both new diagnostic approaches and innovative personalized methods of patients' management. In the framework of this review, the main data on intertumor heterogeneity of GB are summarized. The basic genetic, epigenetic and proteomic aspects of the modern understanding of GB molecular profile and intertumor heterogeneity are considered.

**Keywords:** glioblastoma, intertumor heterogeneity, glioblastoma genetics, mutations

**Corresponding author:** Pavel V. Nikitin. E-mail: [nikitinpaulv@yandex.ru](mailto:nikitinpaulv@yandex.ru)

**For citation:** Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Potapov A.A., Galstyan S.A., Kim D.S., Panina T.N., Shugai S.V., Starovoitov D.V., Khokhlova E.A., Zubova I.V. Glioblastoma molecular and histological heterogeneity. Clin. exp. morphology. 2020;9(3):5–11 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.5-11

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

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

Received 25.03.2020. Received in revised form 29.04.2020. Accepted 14.05.2020.

## Введение

Гетерогенность свойств опухолей представляет собой серьезную диагностическую и лечебную проблему. Она проявляется изменчивостью и вариабельностью генетических, протеомных и эпигенетических параметров как между разными образцами одного и того же гистологического варианта опухоли, так и между различными участками с наличием разнородных клеточных популяций в рамках единого новообразования у конкретного пациента [1]. В соответствии с этим выделяются межопухолевая и внутриопухолевая молекулярно-генетическая гетерогенность опухолей. Различия молекулярного статуса транслируются в многоликость фенотипических свойств опухолевых клеток и могут быть одной из ключевых причин неэффективности как лекарственных, так и лучевых методов лечения опухолей [2].

Глиобластома (ГБ) занимает третье место по частоте встречаемости среди всех опухолей центральной нервной системы (ЦНС), но при этом лидирует среди первичных злокачественных новообразований данной локализации: на ГБ приходится 15,1% всех первичных опухолей головного мозга и 46,1% первичных злокачественных опухолей головного мозга [3]. Кроме того, ГБ является одной из самых смертельных опухолей среди всех видов новообразований у человека. Так, пятилетняя выживаемость при данном заболевании составляет 5,1% [3]. Высокая смертность и низкая эффективность современных лечебных подходов – и общепринятых, и экспериментальных – во многом обусловлены изменчивостью и гетерогенностью ГБ. Описание и характеристика основных свойств и закономерностей межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенности могут способствовать формированию новых, более глубоких представлений о канцерогенезе глиом и использоваться для практической реализации.

В рамках данного обзора рассматриваются проблемы межопухолевой гетерогенности ГБ.

Изменения и перестройки молекулярно-биологического комплекса ГБ достаточно обширны, и их механизмы разнообразны.

## Роль мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* и современная классификация ВОЗ

Одним из последних по времени открытий в области молекулярных свойств диффузных глиальных опухолей стало выявление точковых мутаций генов *IDH1* и *IDH2*, сыгравшее огромную роль в переосмыслении патогенеза и оценки молекулярного статуса глиом в рутинной клинической практике, что нашло непосредственное отражение в классификации ВОЗ опухолей ЦНС 4-го пересмотра [4]. Гены *IDH1* и *IDH2* кодируют две изоформы фермента изоцитратдегидрогеназы: ген *IDH1* – цитоплазматическую, ген *IDH2* – митохондриальную. Данные ферменты катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата и принадлежат двум различным подклассам, один из которых

использует НАД(+) в качестве акцептора электронов, а другой НАДФ(+). Белок, кодируемый геном *IDH1*, является НАДФ(+)-зависимой изоцитратдегидрогеназой, обнаруженной в цитоплазме и пероксисомах. Присутствие этого фермента в пероксисомах предполагает его роль в регенерации НАДФН для осуществления пероксисомальных восстановительных реакций. Цитоплазматический фермент участвует в выработке цитоплазматического НАДФН. Ген *IDH2* кодирует белок, являющийся НАДФ(+)-зависимой изоцитратдегидрогеназой, обнаруженной в митохондриях. Данный фермент вносит вклад в энергетический метаболизм клеток, катализируя самую медленную реакцию в цикле трикарбоновых кислот – превращение изоцитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат [5].

В последние годы было показано, что мутация генов *IDH1* и *IDH2* служит самым точным фактором прогноза прогрессирования диффузных глиальных опухолей, при этом наличие данной мутации непосредственно ассоциировано с повышенной выживаемостью пациентов [6]. Именно поэтому мутации генов *IDH1* и *IDH2* являются на сегодняшний день одним из главных прогностических факторов в диагностике глиом [4]. В рамках современной классификации ВОЗ 2016 года ГБ, которым присвоен Grade IV, подразделяются на следующие нозологические варианты: ГБ без мутации в гене *IDH1* или *IDH2* (ГБ IDH-дт), эпителиоидная ГБ, гигантоклеточная ГБ, глиосаркома, ГБ с мутацией в гене *IDH1* или *IDH2* (ГБ IDH-мт) [4]. При этом необходимо отметить, что ГБ IDH-дт часто называют первичными ГБ, в силу того, что они предположительно возникают как высокозлокачественная глиальная опухоль *de novo*, и по своим гистологическим и молекулярным признакам новообразование изначально соответствует ГБ. В то же время ГБ IDH-мт называют вторичными, так как, согласно общепринятой точке зрения, они возникают из предсуществующих глиальных опухолей более низкой степени злокачественности, подвергающихся относительно продолжительной (в сравнении с патогенезом первичной ГБ) эволюции с постепенным нарастанием злокачественного потенциала и превращением в ГБ [7].

Было показано, что мутация гена *IDH1* или *IDH2* приводит к масштабным изменениям различных компонентов канцерогенеза. Так, в клетках, несущих данную мутацию, возникает гиперпродукция особого онкометаболита – 2-гидроксиглутарата (2HG), приводящая к существенным перестройкам в эпигенетической регуляции активности генома: исследование эпигенома большого набора глиом промежуточного класса злокачественности продемонстрировало наличие значительного гиперметилирования. Введение мутантного *IDH1* в культуру человеческих астроцитов изменяет специфическое метилирование и ацетилирование гистонов, индуцирует обширное гиперметилирование ДНК и перестраивает метилом пораженных клеток, делая его похожим на метилом клеток глиом с более низкой степенью злокачественности [8]. Кроме того,

эпигеномные изменения, возникающие в результате мутации *IDH1*, приводят к инактивации некоторых протоонкогенов, но в то же время наблюдается и эпигенетическая стимуляция ряда механизмов, способствующих дестабилизации генома клетки [8].

Важную роль играют и генетические изменения, возникающие вследствие мутации генов *IDH1* и *IDH2*. В ряде работ было выявлено как активирующее, так и инактивирующее влияние мутации *IDH* на различные протоонкогены, такие как *PIK3CA*, *KRAS*, *AKT*, *N-MYC*, участвующие в процессах пролиферации, и другие [9]. Также был показан вклад *IDH* генов в активацию процессов ангиогенеза, участвующих в прогрессировании и инвазии опухоли [9].

При этом мутации генов *IDH1* и *IDH2* предполагаются в качестве ранних молекулярных событий в ходе канцерогенеза глиом. В связи с этим ряд исследователей предполагает, что данные мутации являются ключевыми ранними молекулярными изменениями, способствующими возникновению и прогрессированию диффузных глиальных опухолей [10].

### Мутация промотора гена *TERT*

Самое частое молекулярное событие в первичных ГБ – мутация промоторной части гена *TERT*, встречающаяся в 72–90% всех случаев данной опухоли [11]. Ген *TERT* кодирует фермент теломеразу, представляющую собой рибонуклеопротеиновую полимеразу, которая поддерживает длину концов теломер путем добавления повторяющихся нуклеотидов TTAGGG [12]. Экспрессия теломеразы играет существенную роль в клеточном старении, так как она обычно репрессируется в постнатальных соматических клетках, что приводит к прогрессирующему укорочению теломер [12].

Промоторная область гена *TERT* содержит две «горячие точки» для возникновения мутаций. Во взрослых диффузных глиомах *IDH*-дикого типа мутации промотора гена *TERT* находятся в обратной корреляции с мутациями гена *TP53* [13]. Они часты в ГБ *IDH*-дт, но редки во вторичных (*IDH1*-мутантных) ГБ и астроцитомах. Мутации промотора гена *TERT* также часто встречаются при олигодендроглиомах. Данные мутации приводят к активации процесса рекрутирования ГА-связывающего белка, представляющего собой фактор транскрипции, стимулирующий aberrантную экспрессию *TERT* [14]. В *IDH1*-мутантных ГБ и астроцитомах для поддержания длины теломер преимущественно используется альтернативный способ их удлинения, реализуемый с помощью активирующих мутаций в гене *ATRX* [14].

### Амплификация и мутации гена *EGFR*

Ген *EGFR* кодирует рецептор эпидермального фактора роста (EGF), относящийся к тирозинкиназным рецепторам, связывающим лиганды семейства EGF и активирующим несколько сигнальных каскадов для преобразования внеклеточных сигналов в соот-

ветствующие клеточные ответы [15]. Лигандами данного рецептора являются EGF, трансформирующий фактор роста А (TGFA), амфигулин, бетацеллюлин и гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста [15]. Связывание с лигандом запускает гомо- и/или гетеродимеризацию рецептора и аутофосфорилирование ключевых цитоплазматических доменов. Фосфорилированный рецептор рекрутирует адаптерные белки и активирует четыре основных нисходящих сигнальных каскада: RAS-RAF-МЕК-ERK каскад, PI3 киназа-AKT каскад, PLCgamma-ПКС каскад и STAT-каскад [16].

*EGFR* – наиболее часто подвергающийся амплификации ген в ГБ, что приводит к его повышенной экспрессии [17]. Амплификация гена *EGFR* выявляется в 35–45% случаев, причем в 70–90% ГБ с повышенной экспрессией *EGFR* определяется амплификация гена *EGFR* [18, 19]. При этом амплификация *EGFR* редко наблюдается во вторичных ГБ [18]. Амплификация гена *EGFR* часто связана с укорочением различных генов, чаще всего укорочению подвергается сам ген *EGFR* с формированием так называемого варианта рецептора *EGFRvIII*, который присутствует в 20–50% ГБ с амплификацией гена *EGFR* [19]. Этот белок структурно и функционально похож на тирозин-киназный рецептор трансформирующего белка *erbB2* и конститутивно активируется независимо от наличия лиганда. Различные укороченные варианты *EGFR* могут возникать в разных клетках в одной и той же опухоли, что является одним из проявлений внутриопухолевой гетерогенности [18].

### Делеция гена *CDKN2A*

Важную роль в развитии опухолевых поражений могут играть регуляторы клеточного цикла, контролируемые переход из одной фазы цикла в другую и ограничивающие избыточную пролиферативную активность клеток. Ключевым элементом в данной системе – ген ингибитора циклинзависимой киназы 2А (*CDKN2A*), который генерирует несколько вариантов транскрипта, отличающихся по своим первым экзонам. Выявлено по меньшей мере три альтернативно сплайсированных варианта, кодирующих отдельные белки, два из которых являются матрицей для структурно родственных изоформ, действующих как ингибиторы циклинзависимой киназы 4 (*CDK4*). Оставшийся транскрипт включает альтернативный первый экзон и содержит альтернативную открытую рамку считывания. Продукт данного транскрипта функционирует в качестве стабилизатора белка-супрессора опухолей p53, поскольку он может взаимодействовать и секвестрировать E3 убиквитин-протеин-лигазу под названием MDM2, ответственную за деградацию белка p53 [20]. Продукты данного гена действуют как негативные регуляторы клеточной пролиферации, взаимодействуя с *CDK4* и циклинзависимой киназой 6 (*CDK6*). Это подавляет их способность взаимодействовать с цикли-

нами класса D и фосфорилировать белок ретинобластомы. *CDKN2A* часто мутирует или подвергается делеции в самых разных новообразованиях и является важным геном-супрессором опухоли [20].

Изменения в сигнальном пути ретинобластомы происходят почти у 80% всех ГБ [18]. В ГБ делеция *CDKN2A* и изменения гена *RB1* являются взаимоисключающими [18]. Инактивация *CDKN2A* распространена как при первичной, так и при вторичной ГБ. Ген *CDK4* амплифицируется приблизительно в 15% всех злокачественных глиом, особенно в тех случаях, когда нет гомозиготной делеции *CDKN2A* [19]. Гомозиготная делеция *CDKN2A* часто также включает соседний ген *CDKN2B*. В целом, делеция *CDKN2A* встречается в 35–50% случаев ГБ [19]. В недавнем исследовании М. Shirahata с коллегами выделили три независимые прогностические группы IDH-мутантных астроцитарных глиом. При этом наиболее значимой для показателей общей выживаемости была гомозиготная делеция *CDKN2A/B*, в наибольшей степени определяющая негативный прогноз течения заболевания [21].

### Мутации гена *TP53*

Большое значение для канцерогенеза имеет состояние антионкогенных механизмов, которые обеспечивают противоопухолевую защиту клеток. Одним из самых важных факторов, определяющих антионкогенную защиту и ее характер, является ген *TP53*. Продукт данного гена, так называемый клеточный опухолевый антиген p53, действует как опухолевый супрессор во многих тканях, он вызывает остановку роста или апоптоз в зависимости от физиологических условий и типа клеток [22]. Данный белок вовлечен в регуляцию клеточного цикла в качестве трансактиватора, который ингибирует процессы клеточного деления, контролируя набор генов, необходимых для этого процесса, в частности активированный *MDM2*. Кроме того, p53 предотвращает активацию циклинзависимой киназы 7 (ЦЗК7) в ответ на повреждение ДНК, тем самым останавливая прогрессирование клеточного цикла [23]. Наряду с этим p53 регулирует циркадные ритмы, подавляя CLOCK-ARNTL/BMAL1-опосредованную транскрипционную активацию гена *PER2* [23].

Изменения в сигнальном пути белка p53 происходят почти в 90% ГБ. Мутации *TP53* чаще встречаются во вторичных ГБ, в этих опухолях они наблюдаются практически всегда, причем почти во всех случаях мутации уже присутствуют в предшественниках в виде диффузных или анапластических астроцитов. Они значительно реже встречаются в первичных ГБ (присутствуют в 25% случаев) [19]. Наиболее распространены точковые мутации в области цитозиновых островков гена *TP53* [19]. Амплификация или повышенная экспрессия гена *MDM2* является альтернативным механизмом, позволяющим снижать активность p53-регулируемого контроля пролиферации клеток. Амплификация *MDM2* наблюдается менее чем в 10% случаев ГБ без мутаций

гена *TP53*. Повышенная экспрессия *MDM2* наблюдается более чем в 50% случаев первичных ГБ, но только в 11% случаев вторичных ГБ [18].

### Мутации гена *PTEN*

Ген *PTEN* участвует в пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток и мутирует в 15–40% ГБ, при этом мутации наблюдаются почти исключительно в первичных ГБ [18]. Данный ген был идентифицирован как опухолевый супрессор, часто мутирующий при различных опухолевых заболеваниях. Белок PTEN представляет собой фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу. Он является негативным регулятором внутриклеточных уровней фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата и функционирует как опухолевый супрессор, ингибируя путь передачи сигналов через АКТ/РКВ каскад. Изоформа PTEN помогает регулировать энергетический обмен в митохондриях [24]. Выявлено, что укорочение гена *PTEN* в любом локусе и миссенс-мутации гена *PTEN* в области, гомологичной тензину/ауксилину и фосфатазам двойной специфичности, связаны с более злокачественным течением опухолевого процесса в ГБ [24].

### Другие мутационные события

Мутации в гене *NF1* присутствуют примерно в 20% ГБ [18]. Продукт этого гена, белок нейрофибрин, функционирует в качестве ингибитора RAS-каскада [25]. В ГБ мутации гена *NF1* не оказывают значимого влияния на прогноз заболевания для пациентов, в то время как в диффузных и анапластических астроцитомах наличие мутационной инактивации гена *NF1* значимо снижает общую выживаемость пациентов [26].

Мутации и амплификации гена фосфатидилинозитол-3-киназы (*PIK3CA*) относительно редки в глиомах и встречаются в 5–15% случаев [18]. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой каталитическую субъединицу, которая играет ключевую роль в активации сигнальных каскадов, участвующих в клеточном росте, выживании, пролиферации, подвижности и формировании внутренней структуры [27]. Т. Schaefer с коллегами показали, что PIK3CA вместе с белками АКТ1 и SOX2 взаимосвязаны с процессами деления митохондрий, формируя общую сигнальную сеть, регулируемую инвазивность клеток астроцитарных глиом [28]. Кроме того, L.H. Zhang с коллегами выявили, что трехчастный белок-мотив 24 (ТБМ24) связывается с промотором гена *PIK3CA* через его домен PHD-Bromo для активации транскрипции гена *PIK3CA*, таким образом усиливая передачу сигналов по PI3K/АКТ сигнальному пути и регулируя экспрессию фермента репарации ДНК O (6)-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) [29]. Более того, было показано, что *PIK3CA* является одним из ключевых драйверных генов в астроцитарных глиомах различной степени злокачественности даже в отсутствие его мутационных изменений,

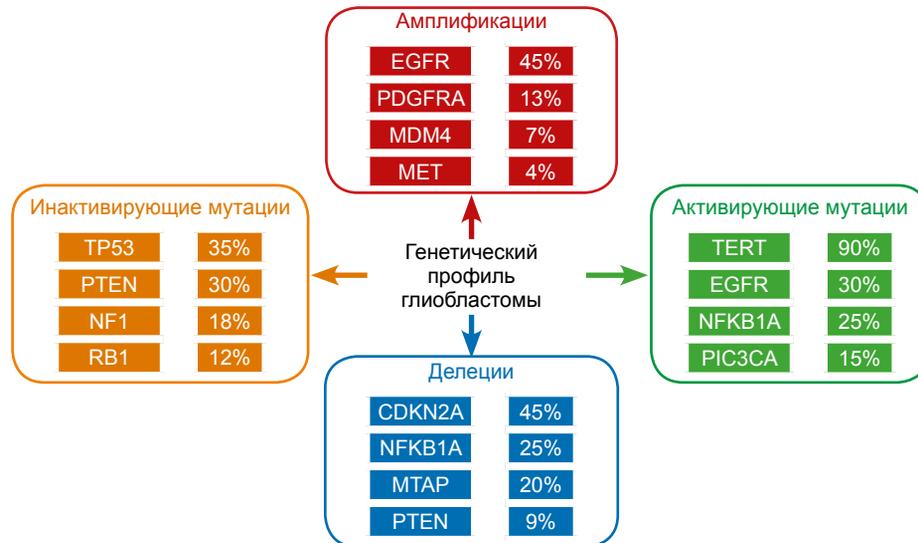


Рис. 1. Генетический профиль глиобластомы. Красным цветом выделены наиболее частые амплификации, синим обозначены делеции, оранжевым определены инактивирующие мутации и зеленым цветом выделены активирующие мутации.

Рядом с каждым видом мутационных изменений приведена его частота в процентах

Fig. 1. Glioblastoma genetic profile. The most frequent amplifications are highlighted in red, deletions – in blue, inactivating mutations – in orange, and activating mutations are highlighted in green. Mutation frequency in percents is stated next to each type of mutational alteration

будучи активированным за счет эпигенетических и протеомических факторов [30, 31].

Ген рецептора тромбоцитарного фактора роста типа A (*PDGFRA*) кодирует тирозинкиназный рецептор на клеточной поверхности для членов семейства тромбоцитарных факторов роста и играет важную роль в регуляции эмбрионального развития, пролиферации клеток, выживания клеток и хемотаксиса [32]. В зависимости от контекста *PDGFRA* может активировать или ингибировать пролиферацию и миграцию клеток [33]. Кроме того, он принимает участие в процессе активации протеинкиназы C. Наряду с этим *PDGFRA* фосфорилирует PIK3R1, регуляторную субъединицу PIK3CA, и тем самым опосредует активацию PI3K/АКТ сигнального пути [33]. Он также способствует активации MAP-киназ MAPK1/ERK2 и MAPK3/ERK1 [33]. Амплификация гена *PDGFRA* встречается в 13% случаев ГБ. При этом проведенные исследования не обнаружили влияния амплификаций и мутаций гена на прогноз общей выживаемости пациентов [34].

На приведенном выше рисунке суммированы основные мутационные и цитогенетические события в ГБ (рис. 1).

### Заключение

Представленный и структурированный в рамках данного обзора литературный опыт в отношении молекулярно-генетических характеристик глиобластом демонстрирует, что их межопухолевая гетерогенность, в целом, достаточно разнообразна. Степень этого разнообразия по сути является отражением опухолевой изменчивости и способности в силу своих молекулярных и гистогенетических особенностей клеток

конкретного вида опухолей к генетическим, а вслед за ними и фенотипическим модификациям. В этом отношении глиобластома стоит далеко не на первом месте: разнообразие мутационных изменений и степень мутационной нагрузки в таких опухолях, как карциномы легкого [35], кишечника [36] или желудка [37], существенно выше. Тем не менее таргетная терапия, ингибирующая наиболее заметные элементы этого богатого генетического ландшафта, оказывается весьма эффективной в лечении соматических карцином. В то же время при наличии более узкого мутационного профиля глиобластомы аналогичной таргетной терапии практически не поддаются. Одной из основных причин подобных результатов является уже не межопухолевая, а внутриопухолевая гетерогенность, которая станет предметом следующего обзора.

### Литература/References

1. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396–401. DOI: 10.1126/science.1254257.
2. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013;501(7467):355–64. DOI: 10.1038/nature12627.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol*. 2016;18(suppl\_5):v1–v75. DOI: 10.1093/neuonc/now207.
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous

- System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
5. *Geisbrecht BV, Gould SJ.* The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1999;274(43):30527–33. DOI: 10.1074/jbc.274.43.30527.
  6. *Hartmann C, Hentschel B, Simon M, Westphal M, Schackert G, Tonn JC et al.* Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):5146–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0017.
  7. *Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A.* Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):829–48. DOI: 10.1007/s00401-015-1432-1.
  8. *Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483(7390):479–83. DOI: 10.1038/nature10866.
  9. *Wakimoto H, Tanaka S, Curry WT, Loebel F, Zhao D, Tateishi K et al.* Targetable signaling pathway mutations are associated with malignant phenotype in IDH-mutant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):2898–909. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3052.
  10. *Демьяшкин Г.А., Никитин П.В.* IDH1 и IDH2 мутации в глиальных опухолях головного мозга – новый антионкогенный механизм. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2018;118(4):134–139. DOI: 10.17116/jnevro201811841134-139
  11. *Demyashkin GA, Nikitin PV.* IDH1- and IDH2-mutations in brain glial tumors – the new antioncogenic mechanism. *S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry.* 2018;118(4):134–139 (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro201811841134-139.
  11. *Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H et al.* Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499–508. DOI: 10.1056/NEJMoa1407279.
  12. *Moriarty TJ, Ward RJ, Taboski MA, Autexier C.* An anchor site-type defect in human telomerase that disrupts telomere length maintenance and cellular immortalization. *Mol Biol Cell.* 2005;16(7):3152–61. DOI: 10.1091/mbc.e05-02-0148.
  13. *Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H.* TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):931–7. DOI: 10.1007/s00401-013-1163-0.
  14. *Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP et al.* Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science.* 2015;348(6238):1036–9. DOI: 10.1126/science.aab0015.
  15. *Arcaro A, Zvebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J.* Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol.* 2000;20(11):3817–30. DOI: 10.1128/mcb.20.11.3817-3830.2000.
  16. *Runkle KB, Kharbanda A, Stypulkowski E, Cao XJ, Wang W, Garcia BA et al.* Inhibition of DHHC20-Mediated EGFR Palmitoylation Creates a Dependence on EGFR Signaling. *Mol Cell.* 2016;62(3):385–96. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.04.003.
  17. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Cancer Genome Atlas Research Network.* *Nature.* 2008;455(7216):1061–8. DOI: 10.1038/nature07385.
  18. *Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.
  19. *Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013;155(2):462–77. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
  20. *Bockstaele L, Kooken H, Libert F, Paternot S, Dumont JE, de Launoit Y et al.* Regulated activating Thr172 phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4(CDK4): its relationship with cyclins and CDK ‘inhibitors’. *Mol Cell Biol.* 2006;26(13):5070–85. DOI: 10.1128/MCB.02006-05.
  21. *Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F et al.* Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):153–66. DOI: 10.1007/s00401-018-1849-4.
  22. *Schneider E, Montenarh M, Wagner P.* Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene.* 1998;17(21):2733–41. DOI: 10.1038/sj.onc.1202504.
  23. *Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell.* 2012;149(7):1536–48. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.014.
  24. *Costa HA, Leitner MG, Sos ML, Mavrantonis A, Rychkova A, Johnson JR et al.* Discovery and functional characterization of a neomorphic PTEN mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(45):13976–81. DOI: 10.1073/pnas.1422504112.
  25. *Xu W, Yang X, Hu X, Li S.* Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. *Int J Mol Med.* 2014;34(1):53–60. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1756.
  26. *Vizcaino MA, Shah S, Eberhart CG, Rodriguez FJ.* Clinicopathologic implications of NF1 gene alterations in diffuse gliomas. *Hum Pathol.* 2015;46(9):1323–30. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.05.014.
  27. *Burke JE.* Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. *Mol Cell.* 2018;71(5):653–73. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.08.005.
  28. *Schaefer T, Ramadoss A, Leu S, Tintignac L, Tostado C, Bink A et al.* Regulation of glioma cell invasion by 3q26 gene products PIK3CA, SOX2 and OPA1. *Brain Pathol.* 2019;29(3):336–50. DOI: 10.1111/bpa.12670.
  29. *Zhang LH, Yin AA, Cheng JX, Huang HY, Li XM, Zhang YQ et al.* TRIM24 promotes glioma progression and enhances chemoresistance through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncogene.* 2015;34(5):600–10. DOI: 10.1038/onc.2013.593.
  30. *Liang A, Zhou B, Sun W.* Integrated genomic characterization of cancer genes in glioma. *Cancer Cell Int.* 2017;17:90. DOI: 10.1186/s12935-017-0458-y.
  31. *Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ.* PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):7–24. DOI: 10.1038/nrc3860.
  32. *Kelly JD, Haldeman BA, Grant FJ, Murray MJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF)

- stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *J Biol Chem.* 1991;266(14):8987–92.
33. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299(5607):708–10. DOI: 10.1126/science.1079666.
34. Chakravarty D, Pedraza AM, Cotari J, Liu AH, Punko D, Kokoro A et al. EGFR and PDGFRA co-expression and heterodimerization in glioblastoma tumor sphere lines. *Sci Rep.* 2017;7(1):9043. DOI: 10.1038/s41598-017-08940-9.
35. Oberndorfer F, Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol.* 2018;30(2):69–76. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000429.
36. Wolff RK, Hoffman MD, Wolff EC, Herrick JS, Sakoda LC, Samowitz WS et al. Mutation analysis of adenomas and carcinomas of the colon: Early and late drivers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(7):366–76. DOI: 10.1002/gcc.22539.
37. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).pii:E2424. DOI: 10.3390/ijms19082424.

### Информация об авторах

Павел Владимирович Никитин – научный сотрудник лаборатории нейроморфологии и молекулярной диагностики НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Марина Владимировна Рыжова – доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Александр Александрович Потапов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Сюзанна Андраниковна Галстян – ординатор патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Дарья Сергеевна Ким – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Татьяна Николаевна Панина – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Светлана Викторовна Шугай – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Дмитрий Валерьевич Старовойтов – биолог патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Екатерина Андреевна Хохлова – ординатор патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Ирина Васильевна Зубова – медицинский лабораторный техник патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

### Author information

Pavel V. Nikitin – Researcher, Laboratory of Neuromorphology and Molecular Diagnostics, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0003-3223-4584>

Marina V. Ryzhova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>

Alexander A. Potapov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0001-8343-3511>

Suzanna A. Galstyan – Resident, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>

Daria S. Kim – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0003-2354-6930>

Tatyana N. Panina – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0001-6156-0085>

Svetlana V. Shugay – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0001-8079-8523>

Dmitry V. Starovoitov – Biologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0002-1879-393X>

Ekaterina A. Khokhlova – Resident, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0003-3330-9779>

Irina V. Zubova – Laboratory Technician, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.

<https://orcid.org/0000-0003-4210-0360>

## Особенности регуляции и функции инфламмасом при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы

Г.И. Табеева<sup>1</sup>, М.Р. Думановская<sup>1</sup>, А.В. Асатурова<sup>1</sup>, И.М. Богданова<sup>2</sup>, С.З. Саная<sup>3</sup>, А.В. Трегубова<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Хроническое воспаление лежит в основе прогрессирования многих системных заболеваний человека, в том числе ряда гинекологических, таких как эндометриоз и хронический эндометрит. Инфламмасомам принадлежит особая роль в регуляции межклеточных взаимодействий при физиологических и патологических условиях. Патогенез хронического воспаления предполагает проградентное течение, сопровождающееся длительным поддержанием инфламмасом в активном состоянии благодаря избыточному накоплению внутриклеточных и внеклеточных эндогенных молекул, освобождаемых из разрушенных клеток, – DAMPs (damage-associated molecular patterns), неэффективной утилизации их путем аутофагии и стресс-редуцирующих клеточных систем, локальной продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-18), а также ROS (reactive oxygen species), накоплением макрофагов и Т-лимфоцитов, повреждением тканей и развитием фиброза. Белки инфламмасомного комплекса могут служить мишенями для лекарственных препаратов, что позволит повысить эффективность терапии заболеваний, связанных с воспалением. В обзоре представлены современные данные о роли NLRP3-инфламмасом в иммунной регуляции и молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенеза эндометриоза и хронического эндометрита. Понимание молекулярных механизмов активации инфламмасом и поиск их эффективных ингибиторов, а также оценка терапевтического потенциала при этих патологических состояниях являются важным направлением исследований.

**Ключевые слова:** инфламмасома, воспаление, врожденный иммунитет, эндометриоз, хронический эндометрит

**Для корреспонденции:** Александра Вячеславовна Асатурова. E-mail: a.asaturova@gmail.com

**Для цитирования:** Табеева Г.И., Думановская М.Р., Асатурова А.В., Богданова И.М., Саная С.З., Трегубова А.В. Особенности регуляции и функции инфламмасом при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):12–20. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.12-20

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

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

Статья поступила 25.05.2020. Получена после рецензирования 23.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Features of regulation and function of inflammasomes in inflammatory diseases of the female reproductive system

G.I. Tabeeva<sup>1</sup>, M.R. Dumanovskaya<sup>1</sup>, A.V. Asaturova<sup>1</sup>, I.M. Bogdanova<sup>2</sup>, S.Z. Sanaya<sup>3</sup>, A.V. Tregubova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Chronic inflammation underlies the progression of many human systemic disorders, including a number of gynecological diseases such as endometriosis and chronic endometritis. Inflammasomes play a special role in the regulation of intercellular interactions under physiological and pathological conditions. The pathogenesis of chronic inflammation assumes a gradual course, accompanied by prolonged maintenance active state of inflammasomes due to the excessive accumulation of intracellular and extracellular endogenous molecules released from destroyed cells – DAMPs (damage-associated molecular patterns), their ineffective utiliza-

tion by autophagy and stress-reducing cell systems, local production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-18), as well as ROS (reactive oxygen species), accumulation of macrophages and T-lymphocytes, tissue damage and the development of fibrosis. The proteins of the inflammasome complex can serve as targets for drugs, which will increase the efficiency of therapy for inflammation-associated diseases. This review presents the current data on the role of NLRP3-inflammasomes in immune regulation and the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of endometriosis and chronic endometritis. Understanding the molecular mechanisms of inflammasome activation and the discovery of their effective inhibitors, as well as the assessment of the therapeutic potential in these pathologies, is an important direction of future research

**Keywords:** inflammasome, inflammation, innate immunity, endometriosis, chronic endometritis

**Corresponding author:** Aleksandra V. Asaturova. E-mail: a.asaturova@gmail.com

**For citation:** Tabeeva G.I., Dumanovskay M.R., Asaturova A.V., Bogdanova I.M., Sanaya S.Z., Tregubova A.V. Features of regulation and function of inflammasomes in inflammatory diseases of the female reproductive system. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(3):12–20 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.12-20

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

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

**Received** 25.05.2020. **Received in revised form** 23.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

## Введение

Инфекционно-воспалительные заболевания, по данным мировой статистики, занимают ведущее место в структуре гинекологической патологии, являясь основной причиной нарушения репродуктивной функции, и, несмотря на современные методы диагностики и лечения, частота их продолжает неуклонно увеличиваться. Воспаление как защитная, ответная реакция иммунной системы направлено на элиминацию инфекционного агента и ликвидацию вызванных им деструктивных изменений в тканях. Своевременное распознавание инфекционных агентов и их быстрая нейтрализация путем формирования локальной воспалительной реакции необходимы для предотвращения генерализации воспаления [1]. Тем не менее в ряде случаев процесс может становиться хроническим и протекать уже в отсутствие микробного агента. Хроническое воспаление лежит в основе прогрессирования многих системных заболеваний человека, развивающихся в результате метаболических нарушений и нередко возникающих в пожилом возрасте, а также ожирения, атеросклеротического поражения сосудов, онкопатологии, синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), хронического гломерулонефрита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), саркоидоза и ряда гинекологических заболеваний, таких как эндометриоз и хронический эндометрит [2].

Так, эндометриоз рассматривают в качестве воспалительного заболевания, развившегося на фоне аномального иммунного ответа. Повышенная активация макрофагов способствует секреции провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) и факторов роста (fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) в эктопических очагах и аутопическом эндометрии при эндометриозе, что, вероятно, приводит к стимуляции адгезии и инвазии ткани эндометрия к мезотелиальным клеткам, а так-

же поддержанию воспалительного процесса в эндометрии [3]. Кроме того, есть данные, что нарушение микробиоты кишечника и полости матки может способствовать повышению выброса провоспалительных цитокинов – интерлейкина (interleukin, IL), IL-1, IL-17 и IL-8, поддерживая воспалительный процесс при эндометриозе и хроническом эндометрите [4].

Изучение молекулярных механизмов хронизации воспалительного процесса позволило F. Martinon, K. Burns и J. Tschopp открыть в 2002 году инфламмосомы – новые маркеры нормальной и патологической воспалительных реакций, регулирующие функциональную активность эффекторных клеток [5].

В ходе исследований было доказано, что сборка специфических молекулярных структур предшествует любой воспалительной реакции. Инфламмосомы – члены семейства цитозольных NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain)-подобных рецепторов (NOD-like receptors, NLR) – являются многобелковым олигомерным комплексом, отвечающим за активацию воспалительного ответа, способствуют созреванию и секреции провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и интерлейкина 18 (IL-18), секреция которых вызывает пироптоз – особый вид программируемой клеточной гибели. Инфламмосомы – цитоплазматические включения, которые образуются в негематопоэтических клетках и служат платформой для привлечения и активации каспазы-1. Структура инфламмосомы состоит из иницирующего, прокаспазы-1-активирующего и эффекторного компонентов [5]. NLRP3 инфламмосома является одним из наиболее полно охарактеризованных белков NLR семейства. NLRP3 – макромолекулярный белковый комплекс, который является главным звеном врожденного иммунного ответа на инфекцию и стресс через активацию каспазы-1 и созревание провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  и IL-18. Активация NLRP3 в течение инфекции может быть протективной, но нерегулируемая избыточная активация каспазы-1 и секреции IL-1 $\beta$  при

ответе на непатогенные эндогенные или экзогенные стимулы может приводить к развитию заболеваний. Инфламмасомам принадлежит особая роль в регуляции межклеточных взаимодействий при физиологических и патологических условиях, что, вероятно, позволит существенно изменить представления о патогенезе воспаления.

В настоящем обзоре представлены современные данные о роли инфламмасом в иммунной регуляции и молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенеза хронических воспалительных заболеваний женской репродуктивной сферы, таких как эндометриоз и хронический эндометрит.

### Инфламмасомы и воспаление

Клетки системы врожденного иммунитета осуществляют защиту организма от инвазирующих патогенов с помощью кодируемых в зародышевой линии рецепторов – PRRs (pattern-recognition receptors). PRRs распознают консервативные микробные структуры – PAMP (pathogen-associated molecular patterns) различного происхождения. PAMPs, распознаваемые PRRs, представлены в цитоплазме, а также могут быть связаны с мембраной клетки или секретированы. Кроме того, PRRs ответственны за распознавание эндогенных молекул, освобождаемых из разрушенных клеток, – DAMPs (damage-associated molecular patterns). К основным классам PRRs относятся трансмембранные рецепторы – TLR (Toll-like receptors) и цитоплазматические белки – NOD. В семействе NLRs различают три подсемейства со специфической молекулярной структурой. NLRPs – самое большое подсемейство NLR белков. Каспаза-1 – активирующие мультибелковые комплексы – инфламмасомы, в которых структурные и распознающие белки принадлежат к NLRP3 подсемейству, являются ключевыми компонентами иммунного ответа и воспаления в системе врожденного иммунитета [6]. В настоящее время наиболее полно охарактеризованы NLRP3 белки этого подсемейства, участвующие в сборке и активации инфламмасом. Сборка и активация инфламмасом приводят к индуцируемому каспазой-1 генерированию активных форм провоспалительных цитокинов, принадлежащих к IL-1 семейству, – IL-1 $\beta$ , IL-18 из белков предшественников. Известно, что мутации гена *NLRP3* вызывают активацию его белка и сверхактивацию каспазы-1 в моноцитах, приводящую к aberrантному созреванию IL-1 $\beta$ , и ассоциированы с предрасположенностью к хроническим аутоиммунным заболеваниям [7–10]. Молекула NLRP3 состоит из 1036 аминокислотных остатков и содержит три домена: С-концевой, центральный нуклеотид-связывающий (NATCH-nucleotide binding domain) и эффекторный N-терминальный. С-концевой домен состоит из семи повторов, обогащенных лейцином (LRR – leucine-rich repeat), и участвует в распознавании различных экзо- и эндогенных агентов, в отсутствие которых этот домен опосредует аутоин-

гибирование NLRP3 через SGT1 и HSP90 шапероны, что, вероятно, поддерживает инфламмасомы в неактивном состоянии [6]. Центральный домен молекулы NLRP3 является основной областью, функционирование которой предопределяет активацию эффекторных доменов. N-терминальный домен участвует во взаимодействии с белками, приводя к активации и рекрутированию каспаз (caspase activation and recruitment domain – CARD) [7]. Второй компонент инфламмасом, цитозольный адапторный белок ASC, состоит из двух доменов: N-терминального пуринового (purin domain) и С-терминального (CARD). Первый связан с основанием инфламмасомы, второй при взаимодействии с одноименным доменом молекулы NLRP3 во время сборки инфламмасом способствует активации каспазы-1 из прокаспазы-1 через усиление транскрипции NF- $\kappa$ B [7]. Каспаза-1, или интерлейкин-превращающий фермент, путем протеолиза расщепляет белки – предшественники воспалительных цитокинов про-IL-1 $\beta$  и про-IL-18 до активных их форм IL-1 $\beta$  и IL-18, играя основную роль в локальном и системном воспалительном ответе [9]. Помимо каспаза-1-зависимого механизма в высвобождении IL-1 из макрофагов участвуют TLRs, активация которых также приводит к транскрипции и трансляции про-IL-1 $\beta$ . Кроме выработки провоспалительных цитокинов, активация каспазы-1 может приводить к быстрой программируемой воспалительной некротической гибели клеток – пироптозу с разрушением плазматической мембраны и освобождением внутриклеточного содержимого, а также развитием отека и осмотического лизиса клеток [6].

Формирование NLRP3-инфламмасом происходит в макрофагах, нейтрофилах, моноцитах, эпителиальных клетках, миелоидных клетках, нейронах, хондроцитах и т.д. [11, 12]. В настоящее время выявлен широкий спектр активаторов инфламмасом, таких как экзогенные PAMPs и эндогенные молекулы, освобождающиеся из поврежденных клеток DAMPs, а также факторы окружающей среды. В качестве PAMPs могут выступать липополисахариды (ЛПС) – структурные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, вирусная двухцепочечная РНК. К DAMPs относят кристаллы эндогенных молекул, в частности натриевой соли мочевой кислоты, повышенный внеклеточный уровень глюкозы, кристаллы холестерина, повышенную концентрацию внеклеточной АТФ, гиалуроновую кислоту, фибриллярный белок амилоид- $\beta$ , белки теплового шока и др. [13]. Среди многочисленных факторов окружающей среды, приводящих к активации инфламмасом, выделяют частицы кремния и асбеста, моноурат натрия, пирофосфат кальция, тринитрофенил хлорид, тринитрохлорбензол, динитрофторбензол, компоненты вакцин, ультрафиолетовое излучение и т.д. [6]. Большинству NLRs свойственна специфичность к одной и нескольким «родственным» PAMP или DAMP, тогда как уникальность NLRP3 состоит в способно-

сти к активации под влиянием множества разнородных стимулов [14].

Серией экспериментальных исследований выявлено, что сборка и активация NLRP3-инфламмасом являются двухстадийным процессом. Исходный сигнал (прайминг) осуществляется PAMPs через активацию TLRs на транскрипционном уровне с участием NF- $\kappa$ B-зависимого сигнального пути, приводящего к повышенной секреции компонентов белка NLRP3 и про-IL-1 $\beta$  и про-IL-18. На второй стадии индукция посттранскрипционных модификаций обеспечивается различными DAMPs. На этой стадии активации инфламмасом происходят олигомеризация NLRP3 и ее последующее объединение с ASC и про-каспазой-1 в мультимолекулярный комплекс, который трансформирует про-каспазу-1 в ее активную форму. Такая стадийность и двойная стимуляция препятствуют случайной, неконтролируемой активации инфламмасомы. Возможно как прямое лиганд-рецепторное взаимодействие, так и опосредованное, в результате инициации лигандами процессов клеточного стресса. В этом случае активированные цитоплазматические белки становятся эффекторами инфламмасом. Механизмы активации NLRP3 и сборки инфламмасом, поддерживаемые большинством исследований, включают в себя отток ионов калия и хлора из клетки, внутриклеточный приток ионов кальция, образование АТФ и реактивных производных кислорода, ROS (reactive oxygen species) в макрофагах, транслокацию NLRP3 в митохондрии, выделение митохондриальной ДНК и кардиолипина, а также катепсинов в цитозоль клетки после лизосомальной дезинтеграции и т.д. В связи с тем, что не все эти события могут индуцироваться агонистами NLRP3, точный механизм активации инфламмасом до конца не изучен.

По одной из гипотез регулирования активности инфламмасом существенное значение отводится аутофагии – лизосомальному деградирующему процессу, играющему важную роль в поддержании клеточного гомеостаза. Образование аутофагосом, вакуолей с двойной мембраной, направлено на поглощение клеточных компонентов, в том числе инфламмасом и про-IL1. Процесс аутолизиса происходит в результате слияния их с лизосомами под действием гидролитических ферментов. Об ингибирующем действии аутофагии на активность инфламмасом свидетельствуют экспериментальные данные, демонстрирующие высокий уровень секреции IL-1 $\beta$  у мышей с дефицитом необходимого компонента аутофагии – autophagy-related protein 16-1 (ATG16L1) [15, 16]. Известно также, что снижение уровня таких ассоциированных с аутофагией белков как LC3B и беклина 1 способствует накоплению дисфункциональных митохондрий и цитозольной митохондриальной ДНК в ответ на ЛПС и АТФ в макрофагах, что приводит к активации NLRP3-инфламмасом и секреции IL-1 $\beta$  и IL-18 [17].

Ряд исследований доказывает, что для активации инфламмасом необходим контакт NLRP3 с митохонд-

риями, который осуществляется с участием белка кардиолипина [18]. Этот фосфолипид, экспрессируемый на внешней мембране митохондрий в результате окислительного стресса и необходимый как для связывания молекул, ассоциированных с аутофагией и апоптозом, так и для взаимодействия NLRP3 с каспазой-1 при сборке инфламмасомы, также играет роль в передаче воспалительных сигналов [18].

Таким образом, все известные эффекторные молекулы независимо от их типа приводят к кратковременному острому воспалению, даже если они поступают из межклеточного пространства. В отличие от этого эндогенные молекулы, запускающие процесс сборки инфламмасом, провоцируют гибель иммунных клеток при длительной их персистенции. Оба состояния завершаются купированием воспалительного процесса. Отсюда следует, что для поддержания инфламмасом в активном состоянии на протяжении длительного времени требуются дополнительные сигналы. Так, патогенез хронического воспаления предполагает проградентное течение, сопровождающееся длительным поддержанием инфламмасом в активном состоянии благодаря избыточному накоплению внутриклеточных, а затем внеклеточных DAMPs, неэффективной утилизации их путем аутофагии и стресс-редуцирующих клеточных систем, локальной продукцией провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18, а также ROS, накоплением M2 макрофагов и Т-лимфоцитов хелперов 2-го типа, повреждением тканей и развитием фиброза [19].

### Эндометриоз

Хроническое воспаление можно рассматривать в качестве патогенетического звена эндометриоза – одного из самых загадочных гинекологических заболеваний. Эктопический очаг эндометриальных желез и стромы, лежащий в основе эндометриоза, характеризуется эстрогенной зависимостью и признаками воспаления. Наиболее частые симптомы – бесплодие и хроническая тазовая боль, наблюдающиеся у 6–10% женщин репродуктивного возраста [20], оказывают существенное негативное влияние на здоровье и качество жизни [21]. Отсутствие точных знаний об этиологии данного заболевания обуславливает отсутствие золотого стандарта лечения эндометриоза. Недостаточная эффективность в отношении купирования болевого синдрома и профилактики рецидивирования эндометриоза – основные недостатки существующих методов терапии [22]. В связи с этим терапевтические стратегии данного заболевания – одна из наиболее сложных проблем для клиницистов.

Теория ретроградной менструации Сэмпсона (1927) является наиболее принятой теорией патогенеза эндометриоза [23]. Однако существует парадокс: ретроградный кровоток распространен среди женщин репродуктивного возраста, тогда как эндометриоз развивается не у всех [24, 25]. Существует гипотеза, согласно которой эндометриоз возникает на

фоне нарушения системы апоптоза – механизма, контролирующего жизнеспособность многоклеточного организма, избавляя его от специализированных клеток, которые в результате накопившихся внутренних повреждений становятся неспособными выполнять свои функции. У здоровых женщин эндометриальные клетки, отторгающиеся во время менструации, гибнут в эктопических очагах по механизму программируемой клеточной смерти. При эндометриозе способность эндометриальных клеток избегать ее, по-видимому, связана с повышением экспрессии антиапоптотических факторов и снижением экспрессии проапоптотических [26]. Есть мнение, что у здоровых женщин рефлюксные фрагменты эндометрия при ретроградной менструации элиминируются в результате пироптоза, индуцированного каспазой-1 [27].

Обсуждается вероятность того, что эффекторные пути активации инфламмосом могут быть вовлечены в патогенез эндометриоза. Возможно, воспаление может приводить к прогрессирующему разрушению тканей, инициирующему развитие хронического заболевания. Ключевым цитокином, участвующим в регуляции адгезии и пролиферации клеток эндометрия, является IL-1 $\beta$  [28, 29]. Увеличение его уровня, а также TNF $\alpha$  индуцируют продукцию IL-6 перитонеальными мезотелиальными клетками, что вносит свой вклад в локальное воспаление, которое наблюдается при эндометриозе [30]. Результаты исследования подтверждают повышение экспрессии IL-1 $\beta$  в эндометриоидных гетеротопиях по сравнению с биоптатами эндометрия здоровых женщин [31].

В литературе в настоящее время обсуждается возможное влияние микробиома на иммунный ответ при эндометриозе. Результаты восьми исследований подтверждено повышение числа грамотрицательных микроорганизмов типа протеобактерий у пациенток с эндометриозом [32–39]. Как уже упоминалось, ЛПС клеточной стенки бактерий активирует систему врожденного иммунитета путем связывания с TLR. Однако нет ясности, происходит ли бактериальное загрязнение в результате прямой миграции из влагалища в полость матки. В экспериментальном исследовании 2019 года показано, что введение метронидазола приводит к уменьшению объема эндометриоидных гетеротопий в малом тазу мышей и степени воспалительного ответа [40]. Вероятно, микробиом кишечника также может модулировать системные воспалительные реакции, а выброс бактериальных продуктов в брюшную полость – активировать аутоиммунный процесс [41, 42].

Для эндометриоза характерно состояние условного доминирования эстрогенов [43]. В кишечном микробиоме существует понятие «эстроболом», отражающее совокупность генов бактерий, продукты которых могут метаболизировать эстрогены в кишечнике. Секреция  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -глюкозидазы способствует декоњуляции эстрогенов, увеличению реабсорбции

свободных фракций, что приводит к повышению их концентрации в периферической крови [44, 45]. В одном из исследований отмечено повышение количества микробов вида *Escherichia coli*, продуцирующих  $\beta$ -глюкуронидазу, в образцах кала пациенток с эндометриозом по сравнению с группой контроля [32]. Имеется предположение, что дисбиотический кишечный микробиом может способствовать формированию гиперэстрогенной среды, которая, в свою очередь, служит причиной прогрессирования эндометриоза.

Кроме этого, Liu et al. было показано, эстрогены, действуя через эстрогеновые рецепторы  $\beta$  (ER $\beta$ ), усиливают активацию инфламмосомы NLRP3 и пролиферацию клеток эндометрия [46]. Результаты проведенных исследований подтверждают, что активация воспаления с помощью NLRP3 способствует метастазированию рака молочной железы, прогрессированию рака легкого и рака простаты, а также рака эндометрия и шейки матки [47–50]. Выявлено, что ER $\beta$  могут взаимодействовать как с NLRP3, так и с каспазой-1. В исследовании на клеточных линиях было показано, что ER $\beta$ -дефицитные клетки имеют сниженный уровень активированной каспазы-1 и IL-1 $\beta$ . Вовлеченность NLRP3 в патогенез эндометриоза показана в экспериментах на лабораторных мышах с дефицитом NLRP3, у которых объем эндометриоидных очагов был значительно меньше по сравнению с контролем [51]. Очаги эндометриоза с выявленной экспрессией ER $\beta$  были устойчивы к TNF-индуцированному апоптозу, и в них определяли более высокий уровень IL-1. Результаты проведенных исследований дают основания предполагать, что ER $\beta$  защищают клетки эндометрия через ингибирование пути TNF-индуцированной гибели клеток и благоприятствуют росту их эктопических очагов, усиливая воспаление, индуцированное секрецией IL-1. Тем не менее роль ER $\beta$  до конца не определена и для уточнения механизмов их влияния на прогрессирование эндометриоза необходимы дальнейшие исследования [51].

### Хронический эндометрит

Хронический эндометрит рассматривают как симптомокомплекс, основой развития которого является не только персистенция бактериально-вирусных агентов в эндометрии, но и длительное присутствие в нем продуктов тканевой деструкции. Последние активируют рецепторы врожденного иммунитета TLRs с последующим развитием цитокинового всплеска, что способствует хронизации воспалительного процесса [52]. Ключевая роль экспрессии IL-1 $\beta$  при эндометрите является основанием для изучения роли NLRP3 инфламмосом в патогенезе его развития.

В настоящее время существует точка зрения об обязательном присутствии в полости матки собственной микробиоты в противовес ранее превалирующему мнению о том, что ее наличие обусловлено контаминацией микробами из нижнего отдела полового тракта.

Полагают, что при отсутствии патологической воспалительной реакции эндометрия наличие определенного микробного сообщества может способствовать поддержанию нормального его гомеостаза. Согласно данным ряда исследований, инфицирование и длительная персистенция условно-патогенных и патогенных микробных агентов и их продуктов (например, ЛПС), а также разрушенных молекул, которые образуются в ходе воспаления, травмы и ишемии эндометрия, способны приводить к чрезмерной активации TLR в популяциях фагоцитов и эпителиальных клеток, сборке NLRP3 инфламмасом и, как следствие, поддержанию повышенной экспрессии IL-1 $\beta$  и IL18, а также привлечению в очаг воспаления натуральных киллерных клеток и лимфоцитов [53]. В настоящее время в экспериментальном исследовании у коров с послеродовым эндометритом в отличие от животных контрольной группы выявлена повышенная экспрессия IL-1 $\beta$  эпителиальными клетками эндометрия и стромальными фибробластами, зависящая от NLRP3 и активности каспазы. Авторы показали, что эти клетки продуцируют компоненты инфламмасом, необходимые для секреции IL-1 $\beta$  [54]. Наряду с этим опубликованы данные о значительном повышении уровня экспрессии NLRP3 и ASC домена, IL-1 $\beta$  и IL-18, а также активности каспазы-1 в эндометрии женщин с привычным выкидышем по сравнению с группой контроля [55].

Терапия хронических заболеваний эндометрия с использованием таких фармакологических препаратов как мелатонин,  $\alpha$ -липоевая кислота, которые способны блокировать сборку инфламмасом и ускорять их дезинтеграцию, оказывает противовоспалительный эффект и положительно влияет на состояние эндометрия [56, 57].

### Терапевтический потенциал инфламмасом в области репродуктивной гинекологии

В исследовании Liu et al. было показано, что miR-520c-3p ингибирует NLRP3 при преэклампсии [58]. Кроме того, ингибитор NLRP3 MCC950 снижает частоту развития преждевременных родов на 35,7%, а уровень неонатальной смертности на 26,7% [59]. Ингибитор инфламмасом NLRP3 глибенкламид тоже предотвращает активацию инфламмасом в клетках трофобласта человека, что является основой терапевтического потенциала для лечения плацентарных нарушений [60].

Другие инфламмасомы, такие как NLRP1 и AIM2, также являются перспективными мишенями в этой области. Например, омега-3 жирные кислоты ингибируют активацию NLRP1 и AIM2 инфламмасом и высвобождение катепсина S трофобласта в цитозоль из лизосом, тем самым снижая риск развития преждевременных родов, связанных с инфекцией и воспалением [61].

Показано, что у пациенток с эндометриозом развитие спаек после хирургического вмешательства может быть связано с усилением экспрессии интерлейкина 1 $\beta$ . В то же время известно ингибирующее воздействие

инфламмасом на продукцию данного фактора, что дает возможность предположить эффективность активации инфламмасом для предотвращения спаечной болезни у пациенток с эндометриозом [62].

Получены данные о возможности активации NLRP3 инфламмасом посредством действия эстрогена через эстрогеновый рецептор  $\beta$ , что, возможно, способствует прогрессированию рака эндометрия. Таким образом, инфламмасомы могут быть точкой приложения в лечении данной патологии [46].

Эффективность воздействия на инфламмасомы для лечения хронического эндометрита была показана на биологических моделях. Терапевтический потенциал модуляторов инфламмасом для лечения воспалительных заболеваний у женщин еще предстоит доказать [62, 63].

Современные данные указывают на потенциальные мишени NLRP1, NLR-2, NLRP3, AIM2, каспазы-1, ASC и IL-1 $\beta$  для терапевтического вмешательства в этой области [64].

### Заключение

Таким образом, понимание молекулярных механизмов активации инфламмасом и поиск эффективных ингибиторов NLRP3, а также оценка их терапевтического потенциала являются важным направлением исследований в области репродуктивной биологии. Белки инфламмасомного комплекса могут служить мишенями для лекарственных препаратов, что позволит повысить эффективность терапии заболеваний, связанных с воспалением. Вероятно, таргетное воздействие на инфламмасомы в комбинации с другими видами терапии будет способствовать повышению эффективности лечения хронических воспалительных заболеваний, таких как эндометриоз и хронический эндометрит, и связанного с ними бесплодия, а также профилактике привычного выкидыша. В настоящее время разрабатываются экспериментальные лекарственные препараты, уменьшающие воспаление, направленные на блокирование разных этапов сборки инфламмасом, в частности связывания активирующих молекул с их рецепторами. Часть из них проходит клинические испытания. Тем не менее для оценки эффективности и безопасности препаратов в лечении различных воспалительных заболеваний потребуется длительное время.

Для улучшения результатов терапии хронического эндометрита и эндометриоза необходимо разработать новые стратегии лечения, основанные на патофизиологических механизмах, направленных на этиологические и патогенетические факторы. Важно понимать новую молекулярную концепцию, включающую воспалительную реакцию и иммунитет.

### Литература/References

1. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

2. *Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф.* Роль инфламмосом в патогенезе социально значимых заболеваний человека. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018;62(1):77–89. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.77-89.  
*Pirozhkov SV, Litvitskiy PF.* Role of inflammasomes in pathogenesis of diseases with a high impact on public health. Pathological physiology and experimental therapy. 2018;62(1):77–89 (In Russ.). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.77-89.
3. *Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, Fedele L.* Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(5):261–75. DOI:10.1038/nrendo.2013.255.
4. *Leonardi M, Hicks C, El-Assaad F, El-Omar E, Gondous G.* Endometriosis and the microbiome: a systematic review. *BJOG.* 2020;127(2):239–49. DOI: 10.1111/1471-0528.15916.
5. *Martinon F, Burns K, Tschopp J.* The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417–26. DOI:10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
6. *Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И.* Роль NOD-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 1. Семейство NLR. Здоровье ребенка. 2013;1(44):154–159.  
*Abaturov AE, Volosovets AP, Yulish EI.* The Role of NOD-like receptors in the recognition of pathogen-associated molecular structures of infectious pathogenic agents and the development of inflammation. Part 1. NLR family. *Child's health.* 2013;1(44):154–159 (In Russ.).
7. *Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE.* Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* 2006;7(12):1250–7. DOI: 10.1038/ni1412.
8. *Lamkanfi M, Kanneganti T-D, Franchi L, Núñez G.* Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):220–5. DOI: 10.1189/jlb.1206756.
9. *Martinon F, Tschopp J.* Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):10–22. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402038.
10. *Богданова И.М.* Инфламмосомы: внутриклеточные регуляторы противинфекционного и воспалительного ответа в системе врожденного иммунитета. Клиническая и экспериментальная морфология. 2016;1:63–69.  
*Bogdanova IM.* Inflammasomes: intracellular regulators of anti-infective and inflammatory response in the system of innate immunity. *Clin. exp. morphology.* 2016;1:63–69 (In Russ.).
11. *Salminen A, Ojala J, Suuronen T, Kaarniranta K, Kauppinen A.* Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6A):2255–62. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00496.x.
12. *Zou J, Crews FT.* Inflammasome-IL-1 $\beta$  signaling mediates ethanol inhibition of hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci.* 2012;6:77. DOI: 10.3389/fnins.2012.00077.
13. *Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G.* Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;12(3):199–200. DOI: 10.1038/ni0311-199.
14. *Swanson KV, Deng M, Ting J P-Y.* The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):477–89. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0.
15. *Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA et al.* Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *J Biol Chem.* 2011;286(11):9587–97. DOI: 10.1074/jbc.M110.202911.
16. *Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature Immunol.* 2012;13(3):255–63. DOI: 10.1038/ni.2215.
17. *Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;12(3):222–30. DOI: 10.1038/ni.1980.
18. *Dudek J.* Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:90. DOI: 10.3389/fcell.2017.00090.
19. *Потаннев М.П.* Иммуные механизмы стерильного воспаления. Иммунология. 2015;36(5):312–318.  
*Potapnev MP.* Immune mechanisms of sterile inflammation. *Immunology.* 2015;36(5):312–318 (In Russ.).
20. *Simoens S, Hummelshoj L, D'Hooghe T.* Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update.* 2007;13(4):395–404. DOI: 10.1093/humupd/dmm010.
21. *Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D.* Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health.* 2014;14:123. DOI: 10.1186/1472-6874-14-123.
22. *Ferrero S, Alessandri F, Racca A, Maggiore ULR.* Treatment of pain associated with deep endometriosis: alternatives and evidence. *Fertil Steril.* 2014;104(4):771–92. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.031.
23. *Sampson JA.* Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14(2):422–69. DOI: 10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
24. *Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM.* Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64(2):151–4.
25. *Liu DT, Hitchcock A.* Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(8):859–62. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1986.tb07995.x.
26. *Nasu K, Yug A, Tsuno A, Nishida M, Narahara H.* Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol Histopathol.* 2009;24(9):1181–92. DOI: 10.14670/HH-24.1181.
27. *Miao EA, Rajan JV, Aderem A.* Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011;243(1):206–14. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x.
28. *Cao W-G, Morin M, Metz C, Maheux R, Akoum A.* Stimulation of macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells by interleukin 1, beta involving the nuclear transcription factor NFkappaB. *Biol Reprod.* 2005;73(3):565–70. DOI: 10.1095/biolreprod.104.038331.
29. *Sillem M, Prifti S, Monga B, Arslan T, Runnebaum B.* Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-1 (IL-1). *Eur*

- J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;87(2):123–7. DOI:10.1016/S0301-2115(99)00114-1.
30. Topley N, Jörres A, Luttmann W, Petersen MM, Lang MJ, Thierauch KH et al. Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: induction by IL-1 beta and TNF alpha. *Kidney Int.* 1993;43(1):226–33. DOI: 10.1038/ki.1993.36.
  31. Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M, Carlström K. Interleukin 1  $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril.* 2001;75(3):489–95. DOI: 10.1016/S0015-0282(00)01752-0.
  32. Ata B, Yıldız S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A et al. The endobiota study: comparison of vaginal, cervical and gut microbiota between women with stage 3/4 endometriosis and healthy controls. *Sci Rep.* 2019;9(1):2204. DOI: 10.1038/s41598-019-39700-6.
  33. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;199:69–75. DOI:10.1016/j.ejogrb.2016.01.040.
  34. Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2014;29(11):2446–56. DOI: 10.1093/humrep/deu222.
  35. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T et al. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;94(7):2860–3.e1-3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.053.
  36. Akiyama K, Nishioka K, Khan KN, Tanaka Y, Mori T, Nakaya T et al. Molecular detection of microbial colonization in cervical mucus of women with and without endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2019; 82(2):e13147. DOI: 10.1111/aji.13147.
  37. Shan J, Sun S, Cheng W, Zhai D, Zhang DY, Yao RP et al. The intestinal flora characteristics of endometriosis and the intervention of traditional Chinese medicine. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80:37. DOI: 10.1111/aji.43\_12981
  38. Yuan M, Li D, Zhang Z, Sun H, An M, Wang G. Endometriosis induces gut microbiota alterations in mice. *Hum Reprod.* 2018;33(4):607–16. DOI: 10.1093/humrep/dex372.
  39. Cregger MA, Lenz K, Leary E, Leach R, Fazleabas A, White B et al. Reproductive microbiomes: using the microbiome as a novel diagnostic tool for endometriosis. *Reprod Immunol.* 2017;2(3):36. DOI: 10.21767/2476-1974.100036.
  40. Chadchan SB, Cheng M, Parnell LA, Yin Y, Schriefer A, Mysorekar IU et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota. *Hum Reprod.* 2019;34(6):1106–16. DOI: 10.1093/humrep/dez041.
  41. Borody TJ, Khoruts A. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(2):88–96. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.244.
  42. Ellekilde M, Selfjord E, Larsen CS, Jaksevic M, Rune I, Tranberg B et al. Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Sci Rep.* 2014;4:5922. DOI: 10.1038/srep05922.
  43. Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;83(1–5):149–55. DOI: 10.1016/S0960-0760(02)00260-1.
  44. Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe.* 2011;10(4):324–35. DOI:10.1016/j.chom.2011.10.003.
  45. Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(8):djw029. DOI:10.1093/jnci/djw029.
  46. Liu SG, Wu XX, Hua T, Xin XH, Feng DL, Chi SQ et al. NLRP3 inflammasome activation by estrogen promotes the progression of human endometrial cancer. *Oncotargets Ther.* 2019;12:6927–36. DOI: 10.2147/OTT.S218240.
  47. Zhang B, Zhang Y, Zhang X, Lv Y. Suspension state promotes extravasation of breast tumor cells by increasing integrin  $\beta$ 1 expression. *Biocell.* 2018;42(1):17–24. DOI: 10.32604/bi-cell.2018.06115.
  48. He A, Shao J, Zhang Y, Lu H, Wu Z, Xu Y. CD200Fc reduces LPS induced IL-1 $\beta$  activation in human cervical cancer cells by modulating TLR4-NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome pathway. *Oncotarget.* 2017;8(20):33214–24. DOI:10.18632/oncotarget.16596.
  49. Wang Y, Kong H, Zeng X, Liu W, Wang Z, Yan X et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2016;35(4):2053–64. DOI: 10.3892/or.2016.4569.
  50. Dupaul-Chicoine J, Arabzadeh A, Dagenais M, Douglas T, Champagne C, Morizot A et al. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. *Immunity.* 2015;43(4):751–63. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.08.013.
  51. Han SJ, Jung SY, Wu SP, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S et al. Estrogen receptor  $\beta$  modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis. *Cell.* 2015;163(4):960–74. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.034.
  52. Гомболевская Н.А. Совершенствование диагностики и терапии хронического эндометрита у женщин в репродуктивном возрасте: Дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2016. *Gombolevskaya NA.* Improvement of diagnostics and therapy of chronic endometritis in women of reproductive age. Candidate Dissertation (Med. Sci.). Moscow, 2016 (In Russ.).
  53. D'Ippolito S, Tersigni C, Marana R, Di Nicuolo F, Gaglione R, Rossi ED et al. Inflammasome in the human endometrium: further step in the evaluation of the “maternal side”. *Fertil Steril.* 2016;105(1):111-8.e1-4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.027.
  54. Kelly P, Meade KG, O'Farrelly C. Non-canonical Inflammasome-Mediated IL-1 $\beta$  Production by Primary Endometrial Epithelial and Stromal Fibroblast Cells Is NLRP3 and Caspase-4 Dependent. *Front Immunol.* 2019;10:102. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00102.
  55. Tersigni C, D'Ippolito S, Di Nicuolo F, Marana R, Valenza V, Masciullo V et al. Recurrent pregnancy loss is associated to leaky gut: a novel pathogenic modal of endometrium inflammation? *Transl Med.* 2018;16(1):102. DOI: 10.1186/s12967-018-1482-y.
  56. Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Castellani R, Rossi ED, Masciullo V, Specchia M et al. Effect of alpha-lipoic acid and myoinositol on endometrial inflammasome from recurrent pregnancy loss women. *Am J Reprod Immunol.* 2019;82(3):e13153. DOI: 10.1111/aji.13153.

57. *Hu X, Li D, Wang J, Guo J, Li Y, Cao Y et al.* Melatonin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced endometritis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2018;64:101–9. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.08.028.
58. *Liu Z, Zhao X, Shan H, Gao H, Wang P.* microRNA-520c-3p suppresses NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cascade in preeclampsia by downregulating NLRP3. *Inflamm Res.* 2019;68(8):643–54. DOI: 10.1007/s00011-019-01246-8.
59. *Gomez-Lopez N, Romero R, Garcia-Flores V, Leng Y, Miller D, Hassan SS et al.* Inhibition of the NLRP3 inflammasome can prevent sterile intra-amniotic inflammation, preterm labor/birth, and adverse neonatal outcomes†. *Biol Reprod.* 2019;100(5):1306–18. DOI: 10.1093/biolre/iory264.
60. *Tamura K, Ishikawa G, Yoshie M, Ohneda W, Nakai A, Takeshita T et al.* Glibenclamide inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  secretion in human trophoblasts. *J Pharmacol Sci.* 2017;135(2):89–95. DOI:10.1016/j.jphs.2017.09.032.
61. *Chen CY, Chen CY, Liu CC, Chen CP.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce preterm labor by inhibiting trophoblast cathepsin S and inflammasome activation. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(20):2221–39. DOI: 10.1042/CS20180796.
62. *Stocks MM, Crispens MA, Ding T, Mokshagundam S, Bruner-Tran KL, Osteen KG.* Therapeutically targeting the inflammasome product in a chimeric model of endometriosis-related surgical adhesions. *Reprod Sci.* 2017;24(8):1121–8. DOI:10.1177/1933719117698584.
63. *Wu H, Dai A, Chen X, Yang H, Li X, Huang C et al.* Leonurine ameliorates the inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced endometritis. *Int Immunopharmacol.* 2018;61:156–61. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.06.002.
64. *De Rivero Vaccari JP.* The inflammasome in reproductive biology: a promising target for novel therapies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:8. DOI: 10.3389/fendo.2020.00008.

### Информация об авторах

Гюзьяль Искандеровна Табеева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения гинекологической эндокринологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

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

Александра Вячеславовна Асатурова – кандидат медицинских наук, заведующая 1-м патологоанатомическим отделением НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Ирина Марковна Богданова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Севастина Зурабовна Саная – студентка 6-го курса Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Анна Васильевна Трегубова – младший научный сотрудник 1-го патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

### Author information

Guzyal I. Tabeeva – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Gynecological Endocrinology, V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0003-1498-6520>

Madina R. Dumanovskaya – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Gynecological Endocrinology, V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-7286-6047>

Alexandra V. Asaturova – Cand. Sci. (Med.), Head of the 1st Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-8739-5209>

Irina M. Bogdanova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Sevastina Z. Sanaya – 6<sup>th</sup> year student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). <https://orcid.org/0000-0001-8289-3380>

Anna V. Tregubova – Junior Researcher, 1st Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0003-4601-1330>

© Сальков В.Н., Худоерков Р.М., 2020

DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.21-26

УДК: 616.894-053.8-091.8

## Изменение содержания меди и цинка в структурах головного мозга при болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера

*В.Н. Сальков, Р.М. Худоерков*

ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

В статье рассматриваются современные данные об изменениях содержания меди и цинка в структурах головного мозга при нейродегенеративных заболеваниях – болезни Паркинсона (БП) и болезни Альцгеймера (БА). Обсуждается способность этих микроэлементов связываться с клеточными белками ( $\alpha$ -синуклеином при БП и  $\beta$ -амилоидом при БА) и нарушать их метаболизм. Анализ литературы показывает, что высокое содержание меди в нейронах нигростриатных образований головного мозга при БП инициирует развитие окислительного стресса, а ее внеклеточный дефицит, нарушая метаболизм железа, способен усиливать этот стресс. Низкое содержание цинка ослабляет антиоксидантные возможности энзимов. Нарушение гомеостаза этих металлов в структурах головного мозга при БА оказывает другое влияние. На ранних стадиях заболевания комплекс, образованный  $\beta$ -амилоидом и ионами меди (II), вовлекается в цепь окислительно-восстановительных реакций, посредством которых формируются свободные радикалы. Последние стимулируют экспрессию медиаторов нейровоспаления, что сопровождается неконтролируемым высвобождением цинка, высокие концентрации которого катализируют образование токсичных форм А $\beta$ -агрегатов.

**Ключевые слова:** головной мозг, медь, цинк, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера

**Для корреспонденции:** Владимир Николаевич Сальков. E-mail: vla-salkov@yandex.ru

**Для цитирования:** Сальков В.Н., Худоерков Р.М. Изменение содержания меди и цинка в структурах головного мозга при болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):21–26. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.21-26

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научного центра неврологии (№ АААА-А19-1190916900081-1).

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

Статья поступила 02.06.2020. Получена после рецензирования 23.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Copper and zinc level alterations in the brain structures in Parkinson's and Alzheimer's diseases

*V.N. Salkov, R.M. Khudoerkov*

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The article reviews the literature on copper and zinc level alterations in the brain structures in neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, PD, and Alzheimer's disease, AD). We discuss the ability of these microelements to bind to cellular proteins ( $\alpha$ -synuclein in PD and  $\beta$ -amyloid in AD) disrupting their metabolism. The literature analysis shows that high copper levels in the neurons of nigrostriatal brain formations in PD initiate oxidative stress development. Copper extracellular deficiency disturbs iron metabolism and thus may increase the stress. Low zinc levels weaken the enzyme antioxidant potential. In AD, disruption of the homeostasis of these metals in the brain structures has a different effect. In the early stages, the complex formed by  $\beta$ -amyloid and copper (II) ions is involved in a series of redox reactions, resulting in the formation of free radicals which stimulate the expression of neuroinflammatory mediator, accompanied by uncontrolled release of zinc, high concentrations of which catalyzing the formation of the toxic forms of aggregated A $\beta$ .

**Keywords:** brain, copper, zinc, Parkinson's disease, Alzheimer's disease

**Corresponding author:** Vladimir N. Salkov. E-mail: vla-salkov@yandex.ru

**For citation:** Salkov V.N., Khudoerkov R.M. Copper and zinc level alterations in the brain structures in Parkinson's and Alzheimer's diseases. Clin. exp. morphology. 2020;9(3):21–26 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.21-26

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Research Center of Neurology (No. АААА-А19-1190916900081-1).

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

Received 02.06.2020. Received in revised form 23.06.2020. Accepted 29.06.2020.

## Введение

В настоящее время в экономически развитых странах неуклонно увеличивается число лиц старших возрастных групп [1], что вызывает неослабевающий интерес к изучению патогенетических закономерностей таких заболеваний, частота которых существенно возрастает при старении, то есть возраст-ассоциированных заболеваний нейродегенеративного характера [2]. Среди последних наиболее распространены болезнь Паркинсона (БП) и болезнь Альцгеймера (БА) [3]. Патогенетической основой этих заболеваний является накопление в структурах ЦНС патологически измененных форм белка: пресинаптического  $\alpha$ -синуклеина при БП и  $\beta$ -амилоида, связанного с клеточной мембраной, при БА [4]. Согласно данным литературы, нарушение процесса формирования третичной структуры (фолдинга) этих белков при нейродегенеративных заболеваниях вызвано окислительным стрессом, обусловленным нарушением метаболизма металлов [5]. Роль одних металлов, в частности железа, в возникновении окислительного стресса раскрыта достаточно полно [6, 7], тогда как других, например меди и цинка, изучена явно недостаточно. Вместе с тем указанные микроэлементы (медь и цинк) необходимы для формирования и функционирования головного мозга и входят в состав металлопротеинов, нарушение метаболизма которых может усиливать окислительный стресс [8]. В связи с изложенным выше мы обобщили в настоящем обзоре данные литературы об изменениях содержания меди и цинка в структурах головного мозга при нейродегенерации и о значении этих изменений для патогенеза БП и БА.

## Особенности метаболизма меди и цинка при БП

В процессе возрастной инволюции содержание меди в структурах головного мозга изменяется поразному: количество меди в области голубого пятна уменьшается, а в черном веществе оно существенно не меняется [9]. В то же время концентрация церулоплазмينا, основного транспортера молекул меди, с возрастом увеличивается в области голубого пятна и не меняется в черном веществе. Увеличение концентрации церулоплазмينا в области голубого пятна у пожилых людей, вероятно, является компенсаторной реакцией, обеспечивающей доставку молекул меди в нейроны в условиях снижения их поступления при старении. Наряду с этим установлено, что у пожилых людей концентрация меди в основном хелатирующем агенте нейронов – нейромеланине оказывается выше в структурах голубого пятна, чем в черном веществе головного мозга [9]. В связи с этим можно предположить, что если при старении концентрация меди в нейронах голубого пятна выше, чем в нейронах черного вещества, то при нейродегенеративном процессе медь может играть не менее значимую роль в дисфункции нейронов голубого пятна, чем железо в дисфункции нейронов черного вещества.

В работах одних авторов, исследовавших содержание меди в черном веществе головного мозга при БП, показано увеличение ее концентрации [10]. В то же время большинство работ других авторов свидетельствует, что содержание меди при БП как в черном веществе, так и в других нигростриатных структурах снижается [11, 12]. Следовательно, данные об изменениях содержания меди в нигростриатных образованиях головного мозга человека при БП противоречивы. Вместе с тем при исследовании концентрации меди в спинномозговой жидкости (ликворе) и плазме крови у пациентов с БП установлено, что в ликворе ее концентрация умеренно увеличивается, а в плазме крови она умеренно снижается [13]. Однако в связи с тем, что ликвор вырабатывается непосредственно в головном мозге, в сосудистых сплетениях его желудочков, а плазма крови является лишь компонентом кровеносной системы, результаты, полученные при исследовании ликвора у пациентов с БП, принято считать более существенными [14].

В литературе показано, что ионы меди (II) способны связываться с  $\alpha$ -синуклеином, содержащим в своей структуре не менее двух участков (сайтов) для подобного связывания [15]. Взаимодействие ионов меди (II) с  $\alpha$ -синуклеином зависит от величины pH и наличия патогенных мутаций  $\alpha$ -синуклеина. Так, при нейтральной величине pH ионы меди (II) связываются с сайтами Met-1 [16] или His-50 [17]  $\alpha$ -синуклеина. При уменьшении величины pH ниже 5,0 связывание ионов меди (II) с сайтом His-50 значительно ухудшается, и  $\alpha$ -синуклеин использует дополнительный способ связывания ионов меди (II) через сайты Asp-119, Asp-121 и Glu-123 [18]. Мутации  $\alpha$ -синуклеина, типичные для наследственных форм БП (A30P, E46K, A53T), демонстрируют в основном аналогичный способ связывания ионов меди (II), за исключением мутации A30P, которая связывается через сайт His-50 [19]. При связывании  $\alpha$ -синуклеина с ионами меди (II) при БП формируются более компактные агрегаты из токсичных олигомеров, что приводит к накоплению патологических форм агрегированного  $\alpha$ -синуклеина [20].

Механизм нейротоксического воздействия меди при БП заключается в следующем [21]: при повышении внутриклеточной концентрации меди она поглощается белками-шаперонами (например, АТОХ1, ССС, МТЗ, и СОХ17), но если концентрация меди в клетке становится избыточной, то белки-шапероны не справляются с регуляцией ее внутриклеточного содержания и свободная медь связывается с убиквитин-протеосомной системой, которая ингибирует ее активность [22]. Последующее связывание  $\alpha$ -синуклеина с ионами меди (II) изменяет окислительно-восстановительный потенциал нейронов, что приводит к образованию продуктов окислительного стресса и, в частности, перекиси водорода, которая, окисляя дофамин, делает его токсичным для дофаминовых нейронов [23]. Кроме того, окисление  $\alpha$ -синуклеина ионами меди (II) нарушает

фолдинг этого белка [24], что изменяет его внутриклеточную локализацию, увеличивает накопление в клетке и создает препятствие аксональному транспорту [25].

Исследование концентрации цинка при БП, проведенное методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в черном веществе, затылочной области коры и веретенообразной извилине, показало, что у пациентов с БП величина этого показателя между исследуемыми структурами головного мозга существенно не различалась [26], но по сравнению с контрольной группой она была ниже в структурах черного вещества. Концентрация цинка в ликворе и плазме крови у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой демонстрировала сходную направленность изменений [13]: она была снижена на 10,8% в ликворе и на 7,5% в плазме крови.

Если учесть, что цинк является кофактором ферментов, обладающих антиоксидантной активностью, и что этот металл проявляет синергическое взаимодействие с дофаминергической системой, логично предположить, что дефицит его в ткани может играть ключевую роль в этиопатогенезе БП. Вместе с тем, как отмечено в литературе [13], установленная корреляция между дефицитом цинка и возникновением заболевания не свидетельствует о наличии между ними прямой причинно-следственной связи, а напротив, может быть примером, подтверждающим существование обратной причинно-следственной связи, то есть усиление клинических проявлений БП может приводить к снижению содержания цинка. Аргументация подобного утверждения основана на результатах метаанализа работ об изменении содержания цинка при БП цитированных выше авторов, которые свидетельствуют, что число исследований и размер изучаемых выборок были явно недостаточными для удовлетворительной статистической точности итоговых оценок. Кроме того, показано [27], что в настоящее время большинство исследований проводят методом поперечных срезов (однократно, так называемые одномоментные исследования), тогда как продольные (лонгитудинальные) исследования могут выявить противоположные результаты.

Таким образом, у исследователей нет единого мнения об изменениях содержания меди в нигростриатных образованиях головного мозга при БП. Одни авторы утверждают, что содержание меди при этом заболевании увеличивается, а другие – что оно снижается. В то же время выявлена способность меди связываться с  $\alpha$ -синуклеином и при определенных условиях (изменение величины pH, мутации и т.д.) приводить к его окислению, тем самым способствуя нарушению фолдинга этого белка и его локализации.

Результаты исследований содержания цинка в структурах головного мозга при БП демонстрируют безусловную однонаправленность – концентрация цинка в черном веществе и ликворе при этом заболевании снижается. Вместе с тем малочисленность такого рода работ, как и характер дизайна самих исследований (пре-

обладание одномоментных исследований над лонгитудинальными) не позволяют однозначно утверждать, что снижение концентрации цинка является одним из этиологических факторов БП.

### **Изменение содержания меди и цинка в структурах головного мозга при БА**

Количественный метаанализ исследований, в которых изучалось содержание ионов металлов в структурах головного мозга при БА, показал, что при этом заболевании в неокортикальных областях концентрация меди снижается, в то время как концентрация цинка остается неизменной [28]. В других исследованиях отмечено увеличение содержания цинка в теменной доле при этом заболевании [29], а также установлена корреляционная зависимость между концентрацией цинка в лобной доле и стадиями БА согласно классификации, предложенной Н. Braak [30]. Кроме того, в литературе показано, что при этом заболевании концентрация меди (II) и цинка увеличивается как непосредственно в амилоидных бляшках [31], так и вокруг них [32].

Общеизвестно представление о том, что металлы могут ускорять олигомеризацию и агрегацию белков. Так,  $\beta$ -амилоид – белок, накапливающийся при БА, олигомеризуется в присутствии меди и цинка [33]. Ионы меди (II) связываются с  $\beta$ -амилоидом [34] через остатки гистидина (His-13, His-14 и His-6) и тирозина (Tyr-10). При взаимодействии с  $\beta$ -амилоидом ионы меди (II) восстанавливаются до одновалентной формы [35]. Кроме того, при этой реакции образуется перекись водорода, накопление которой способно индуцировать окислительный стресс. Оксистеролы и продукты перекисного окисления липидов, образующиеся при каталитическом окислении  $\beta$ -амилоида ионами меди (II), могут стимулировать его олигомеризацию [34]. Отложения  $\beta$ -амилоида вызывают у пациентов с БА нейровоспалительную реакцию, сопровождающуюся активацией микроглии и накоплением свободных радикалов, что значительно усиливает окислительный стресс [5].

Цинк в низких концентрациях ингибирует токсичность  $\beta$ -амилоида [36]. Механизм цитопroteкции низких концентраций цинка полностью не выяснен, но предполагают, что он обусловлен конкуренцией этого металла с медью или железом за связывание с  $\beta$ -амилоидом [35]. Ионы цинка изменяют конформацию  $\beta$ -амилоида таким образом, что ионы меди теряют способность связываться со своими сайтами  $\beta$ -амилоида. Высокие концентрации цинка, высвобождающиеся в структурах головного мозга при окислительном стрессе, катализируют формирование токсичных форм  $A\beta$ -агрегатов, что способствует накоплению  $\beta$ -амилоида [37, 38]. Высокие концентрации цинка могут ингибировать активность белка предшественника бета-амилоида (APP), обладающего в естественных условиях антиоксидантными свойствами и феррооксидазной активностью [39]. В связи с ингибированием

APP нарушаются окисление железа (II) и его транспорт из клетки. Следовательно, высокие внеклеточные концентрации цинка способствуют накоплению в клетках избыточного количества железа, которое усиливает токсичность  $\beta$ -амилоида [40].

Таким образом, при БА концентрация меди снижается в структурах неокортекса и увеличивается в амилоидных бляшках, тогда как концентрация цинка коррелирует со стадией заболевания: на ранних стадиях БА она не меняется, а на более поздних возрастает, демонстрируя нарушение баланса содержания этих металлов – меди и цинка в структурах головного мозга и способствуя накоплению  $\beta$ -амилоида.

### Заключение

Неоднозначность данных литературы об изменениях содержания меди в нигростриатных образованиях головного мозга при болезни Паркинсона, очевидно, связана с тем, что при этом заболевании ионы меди (II) накапливаются в нейронах и оказывают пагубное влияние как на тирозингидроксилазу [41], способствуя образованию токсичных форм дофамина, так и на  $\alpha$ -синуклеин, нарушая фолдинг последнего и способствуя его накоплению [42]. Наряду с этим при болезни Паркинсона развивается внеклеточный дефицит меди, который вызывает дисфункцию церулоплазмينا – купропротеина [43], необходимого для выведения железа из клеток [44]. Перенасыщение железом сайтов связывания (хелатирования) нейромеланина в нейронах черного вещества ослабляет хелатирующие свойства нейромеланина и приводит к высвобождению реактивных форм железа [45]. Накопление реактивных форм железа, участвующего в окислительно-восстановительных реакциях, обуславливает усиление металлоиндуцированного окислительного стресса.

Таким образом, при болезни Паркинсона внутриклеточное накопление меди в нигростриатных структурах инициирует развитие окислительного стресса, а ее внеклеточный дефицит способствует усилению этого стресса, тогда как низкое содержание цинка ослабляет антиоксидантные возможности энзимных систем. Нарушение гомеостаза этих металлов в структурах головного мозга при болезни Альцгеймера оказывает другое влияние. На ранних стадиях заболевания комплекс, образованный  $\beta$ -амилоидом и ионами меди (II), вовлекается в цепь окислительно-восстановительных реакций, посредством которых формируются свободные радикалы [46]. Последние стимулируют экспрессию медиаторов нейровоспаления [47], что сопровождается неконтролируемым высвобождением цинка, высокие концентрации которого катализируют образование токсичных форм  $A\beta$ -агрегатов.

### Литература/References

1. *Fernández-Ballesteros R, Robine JM, Walker A, Kalache A.* Active aging: a global goal. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2013;2013:298012. DOI: 10.1155/2013/298012.

2. А. Шарман, Ж. Жумадилов (ред.). Научные основы наследственного долголетия и антистарения. Нью-Йорк: Mary Ann Liebert, Inc., 2011. 184 с.  
A Sharman, Zh Zhumadilov (eds). The scientific basis for healthy aging and anti-aging processes. New York: Mary Ann Liebert, Inc., 2011. 184 p. (In Russ.).
3. *Иллариошкин С.Н.* Конформационные болезни мозга. Москва: Янус-К, 2003. 248 с.  
*Illarioshkin SN.* Conformational diseases of brain. Moscow: Yanus-K, 2003. 248 p. (In Russ.).
4. *Dickson DW.* Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8):a009258. DOI: 10.1101/cshperspect.a009258.
5. *Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M.* Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010;345(1–2):91–104. DOI: 10.1007/s11010-010-0563-x.
6. *Gerlach M, Double KL, Ben-Shachar D, Zecca L, Youdim MB, Riederer P.* Neuromelanin and its interaction with iron as a potential risk factor for dopaminergic neurodegeneration underlying Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2003;5(1–2):35–44. DOI: 10.1007/bf03033371.
7. *Baksi S, Tripathi AK, Singh N.* Alpha-synuclein modulates retinal iron homeostasis by facilitating the uptake of transferrin-bound iron: Implications for visual manifestations of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:292–306. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.025.
8. *Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AL.* Copper handling machinery of the brain. *Metallomics.* 2010;2(9):596–608. DOI: 10.1039/c0mt00006j.
9. *Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Galorini M et al.* The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(26):9843–8. DOI: 10.1073/pnas.0403495101.
10. *Mezzaroba L, Alferi DF, Simão ANC, Reiche EMV.* The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology.* 2019;74:230–41. DOI: 10.1016/j.neuro.2019.07.007.
11. *Davies KM, Bohic S, Carmona A, Ortega R, Cottam V, Hare DJ et al.* Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2014;35(4):858–66. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.034.
12. *Carboni E, Lingor P.* Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Metallomics.* 2015;7(3):395–404. DOI: 10.1039/c4mt00339j.
13. *Adani G, Filippini T, Michalke B, Vinceti M.* Selenium and other trace elements in the etiology of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Neuroepidemiology.* 2020;54(1):1–23. DOI: 10.1159/000502357.
14. *Johar I, Mollenhauer B, Aarsland D.* Cerebrospinal fluid biomarkers of cognitive decline in Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2017;132:275–94. DOI: 10.1016/bs.irm.2016.12.001.
15. *Rasia RM, Bertoncini CW, Marsh D, Hoyer W, Cherny D, Zweckstetter M et al.* Structural characterization of copper(II) binding to  $\alpha$ -synuclein: insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(12):4294–9. DOI: 10.1073/pnas.0407881102.

16. Binolfi A, Quintanar L, Bertoncini CW, Griesinger C, Fernandez CO. Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: relevance to Parkinson's disease. *Coord Chem Rev.* 2012;256(19–20):2188–201. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.004.
17. Dudzik CG, Walter ED, Abrams BS, Jurica MS, Millhauser GL. Coordination of copper to the membrane-bound form of  $\alpha$ -synuclein. *Biochemistry.* 2012;52(1):53–60. DOI: 10.1021/bi301475q.
18. Drew SC, Leong SL, Pham CL, Tew DJ, Masters CL, Miles LA et al.  $\text{Cu}^{2+}$  binding modes of recombinant  $\alpha$ -synuclein – insights from EPR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2008;130(24):7766–73. DOI: 10.1021/ja800708x.
19. Drew SC, Tew DJ, Masters CL, Cappai R, Barnham KJ. Copper coordination by familial mutants of Parkinson's disease-associated  $\alpha$ -synuclein. *Appl Magn Reson.* 2009;36:223–9. DOI: 10.1007/s00723-009-0020-8.
20. Curtain CC, Kirby NM, Mertens HD, Barnham KJ, Knott RB, Masters CL et al. Alpha-synuclein oligomers and fibrils originate in two distinct conformer pools: a small angle X-ray scattering and ensemble optimisation modeling study. *Mol Biosyst.* 2015;11(1):190–6. DOI: 10.1039/c4mb00356j.
21. Castillo-Gonzalez JA, Loera-Arias MDJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein-copper complex formation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's Dis.* 2017;2017:9164754. DOI: 10.1155/2017/9164754.
22. Sato H, Kato T, Arawaka S. The role of Ser129 phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. *Rev Neurosci.* 2013;24(2):115–23. DOI: 10.1515/revneuro-2012-0071.
23. Rice ME, Russo-Menna I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience.* 1997;82(4):1213–23. DOI: 10.1016/s0306-4522(97)00347-3.
24. Trist BG, Hare DJ, Double KL. A proposed mechanism for neurodegeneration in movement disorders characterized by metal dyshomeostasis and oxidative stress. *Cell Chem Biol.* 2018;25(7):807–16. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.05.004.
25. Volpicelli-Daley LA, Gamble KL, Schultheiss CE, Riddle DM, West AB, Lee VM-Y. Formation of  $\alpha$ -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol Biol Cell.* 2014;25(25):4010–23. DOI: 10.1091/mbc.e14-02-0741.
26. Genoud S, Roberts BR, Gunn AP, Halliday GM, Lewis SJG, Ballg HJ et al. Subcellular compartmentalization of copper, iron, manganese and zinc in the Parkinson's disease brain. *Metallomics.* 2017;9(10):1447–55. DOI: 10.1039/c7mt00244k.
27. Vinceti M, Michalke B, Malagoli C, Eichmüller M, Filippini T, Tondelli M et al. Selenium and selenium species in the etiology of Alzheimer's dementia: the potential for bias of the case-control study design. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;53:154–62. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.03.002.
28. Graham SF, Nasaruddin MB, Carey M, Holscher C, McGuinness B, Kehoe PG et al. Age-associated changes of brain copper, iron, and zinc in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J Alzheimers Dis.* 2014;42(4):1407–13. DOI: 10.3233/JAD-140684.
29. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol.* 2011;94(3):296–306. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.05.001.
30. Szabo ST, Harry GJ, Hayden KM, Szabo DT, Birnbaum L. Comparison of metal levels between postmortem brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease and nondemented elderly controls. *Toxicol Sci.* 2016;150(2):292–300. DOI: 10.1093/toxsci/kfv325.
31. Rajendran R, Minqin R, Ynsa MD, Casadesus G, Smith MA, Perry G et al. A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits—insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(1):91–5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.02.136.
32. Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzirotti A, Miklossy J. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with  $\beta$ -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J Struct Biol.* 2006;155(1):30–7. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.09.004.
33. Faller P, Hureau C, Penna GL. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid- $\beta$  to general principles. *Acc Chem Res.* 2014;47(8):2252–9. DOI: 10.1021/ar400293h.
34. Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem.* 2010;15(1):61–76. DOI: 10.1007/s00775-009-0600-y.
35. Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS et al. Evidence that the  $\beta$ -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A $\beta$  by zinc. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19439–42. DOI: 10.1074/jbc.C000165200.
36. Garai K, Sahoo B, Kaushalya SK, Desai R, Maiti S. Zinc lowers amyloid- $\beta$  toxicity by selectively precipitating aggregation intermediates. *Biochemistry.* 2007;46(37):10655–63. DOI: 10.1021/bi700798b.
37. Cuajungco MP, Lees GJ. Nitric oxide generators produce accumulation of chelatable zinc in hippocampal neuronal perikarya. *Brain Res.* 1998;799(1):118–29. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00463-6.
38. Cuajungco MP, Fagét KY. Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 2003;41(1):44–56. DOI: 10.1016/s0165-0173(02)00219-9.
39. Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K et al. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 2010;142(6):857–67. DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.014.
40. Rottkamp CA, Raina AK, Zhu X, Gaier E, Buch AI, Atwood CS et al. Redox-active iron mediates amyloid- $\beta$  toxicity. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(4):447–50. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00494-9.
41. Abbaoui A, Gamrani H, Hiba OE, Gamrani H. Neuroprotective effect of curcumin-I in copper induced dopaminergic neurotoxicity in rats: a possible link with Parkinson's disease. *Neuroscience Lett.* 2017;660:103–8. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.032.
42. Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A, Lashuel HA. Elucidating the role of site-specific nitration of  $\alpha$ -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease via protein semisynthesis and mutagenesis.

- sis. *J Am Chem Soc.* 2015;137(15):5041–52. DOI: 10.1021/ja5131726.
43. *Ayton S, Lei P, Duce JA, Wong BXW, Sedjahtera A, Adlard PA et al.* Ceruloplasmin dysfunction and therapeutic potential for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2013;73(4):554–9. DOI: 10.1002/ana.23817.
44. *Jeong SY, David S.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cell in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2003;278(29):27144–8. DOI: 10.1074/jbc.M301988200.
45. *Gerlach M, Double KL, Ben-Shachar D, Zecca L, Youdim MBH, Riederer P.* Neuromelanin and its interaction with iron as a potential risk factor for dopaminergic neurodegeneration underlying Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2003;5(1–2):35–44. DOI: 10.1007/bf03033371.
46. *Dikalov SI, Vitek MP, Mason RP.* Cupric-amyloid  $\beta$  peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(3):340–7. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.004.
47. *Григорьев Е.В., Шукевич Д.Л., Плотников Г.П., Хуторная М.В., Цепочкина А.В., Радивилко А.С.* Нейровоспаление в критических состояниях: механизмы и протективная роль гипотермии. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2016;1(3):88–96.
- Grigoriev EV, Shukevich DL, Plotnikov GP, Khutorная MV, Tsepokina AV, Radivilko AS.* Neuroinflammation in critical care: mechanisms and protective role of hypothermia. *Fundamental and clinical medicine.* 2016;1(3):88–96 (In Russ.).

### Информация об авторах

Владимир Николаевич Сальков – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Рудольф Михайлович Худоерков – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

### Author information

Vladimir N. Salkov – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0002-1580-0380>.

Rudolf M. Khudoerkov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology. <https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>.

## Применение антител к везикулярному транспортеру ацетилхолина и ацетилхолинэстеразе в исследованиях пренатального развития парасимпатической иннервации поджелудочной железы человека

Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, Д.А. Отлыга, С.В. Савельев

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

*Введение.* Парасимпатические волокна, иннервирующие поджелудочную железу (ПЖ), участвуют в регуляции ее экзокринной и эндокринной функции, контролируют пролиферацию эндокринных клеток, а также вовлечены в патогенез сахарного диабета 1-го типа. Данные о распределении парасимпатических волокон в ПЖ человека в период внутриутробного развития в литературе отсутствуют. Цель исследования – определить возможность использования маркеров холинергических нейронов и нервных волокон – везикулярного транспортера ацетилхолина (VACHT) и ацетилхолинэстеразы (AChE) для исследования пренатального развития парасимпатической иннервации ПЖ человека.

*Материалы и методы.* Работа выполнена на 10 аутопсиях ПЖ плодов (гестационный возраст 14–34 недели) при помощи иммунопероксидазного маркирования антителами к VACHT и AChE.

*Результаты.* Иммунопозитивная реакция с антителами к AChE выявлена в пучках нервных волокон различного диаметра, сети тонких нервных волокон, а также в отдельных нейронах интрамуральных ганглиев. Реакция с антителами к VACHT в структурах нервной системы была иммунонегативной. На исследованных сроках развития тонкие холинергические волокна преобладали в экзокринной части ПЖ: в междольковой соединительной ткани, вблизи протоков и внутри формирующихся долек. В панкреатических островках холинергические волокна выявлялись реже и были локализованы на периферии. Иммунопозитивная реакция с антителами к AChE и мышинными моноклональными антителами к VACHT выявлена также в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков.

*Заключение.* Установлено, что антитела к AChE позволяют выявлять в развивающейся ПЖ человека холинергические нейроны и нервные волокна. Показано, что в ПЖ тонкие холинергические волокна преобладают в экзокринном отделе железы и редко выявляются в панкреатических островках, что характерно и для взрослых людей. Данные об экспрессии VACHT и AChE в эндокринных клетках панкреатических островков у плодов согласуются с результатами исследований на образцах ПЖ взрослых людей и свидетельствуют о том, что эндокринные клетки могут служить источником ацетилхолина.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, развитие человека, парасимпатическая иннервация, VACHT, AChE

**Для корреспонденции:** Юлия Сергеевна Кривова. E-mail: homulkina@gmail.com

**Для цитирования:** Кривова Ю.С., Прощина А.Е., Отлыга Д.А., Савельев С.В. Применение антител к везикулярному транспортеру ацетилхолина и ацетилхолинэстеразе в исследованиях пренатального развития парасимпатической иннервации поджелудочной железы человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):27–33. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.27-33

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00146.

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

Статья поступила 10.12.2019. Получена после рецензирования 16.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

## Application of antibodies to the vesicular transporter of acetylcholine and acetylcholinesterase in the studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas

Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, D.A. Otylga, S.V. Saveliev

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

*Introduction.* Parasympathetic fibers innervating the pancreas are involved in the regulation of both exocrine and endocrine function, in the regulation of endocrine cell proliferation, and are also implicated in the pathogenesis of type 1 diabetes. Nonetheless, data concerning the distribution of parasympathetic fibers within the human pancreas in prenatal development are absent in the literature.

Our aim was to evaluate the possibility of using the markers of cholinergic neurons and nerve fibers, namely vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and acetylcholinesterase (AChE) in studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas.

*Materials and methods.* The study was performed on 10 autopsies of the fetal pancreas (gestational age 10–34 weeks) using immunoperoxidase labeling with antibodies to VAChT and AChE.

*Results.* Immunopositive reaction to AChE was detected in bundles of nerve fibers of various diameters, networks of thin nerve fibers as well as in individual neurons of the intramural ganglia. The structures of the nervous system were immunonegative to VAChT. In the exocrine pancreas, that is, in the interlobular connective tissue, near the ducts and inside the forming lobules, thin cholinergic fibers prevailed on the studied developmental periods. In pancreatic islets, cholinergic fibers were detected less frequently and were located at the periphery. Immunopositive reaction with antibodies to AChE and mouse monoclonal antibodies to VAChT was also detected in some endocrine cells in the pancreatic islets.

*Conclusion.* We have shown that antibodies to AChE detect cholinergic neurons and nerve fibers in the developing human pancreas. We have also demonstrated that in the fetal pancreas thin cholinergic fibers prevail in the exocrine part and rarely are detected in the pancreatic islets, which is typical in adults. The results showing the VAChT and AChE immunoreactivity in the endocrine cells of fetal pancreatic islets are in agreement with data obtained in the adult human pancreas and suggest that the endocrine cells can be a source of acetylcholine.

**Keywords:** pancreas, human development, parasympathetic innervation, VAChT, AChE

**Corresponding author:** Yuliya S. Krivova. E-mail: homulkina@gmail.com

**For citation:** Krivova Y.S., Proshchina A.E., Otylga D.A., Saveliev S.V. Application of antibodies to the vesicular transporter of acetylcholine and acetylcholinesterase in the studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(3):27–33 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.27-33.

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project № 18-015-00146.

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

**Received** 10.12.2019. **Received in revised form** 16.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

## Введение

Поджелудочная железа (ПЖ) обильно иннервирована волокнами автономной нервной системы. Хорошо известно, что симпатические и парасимпатические волокна играют важную роль в регуляции экзокринной и эндокринной функции ПЖ [1–4]. Ряд экспериментальных исследований свидетельствует об участии парасимпатических волокон в регуляции количества В-клеток: снижение уровня пролиферации В-клеток обнаружено у мышей [5] и крыс [6] после ваготомии. Кроме того, автономная нервная система вовлечена в патогенез ряда заболеваний, в том числе сахарного диабета 1-го типа. При этом заболевании отмечено снижение количества симпатических нервных волокон в панкреатических островках [7] и снижение количества парасимпатических волокон в экзокринном отделе ПЖ [8].

Считается, что парасимпатическая регуляция экзокринной и эндокринной секреции осуществляется преимущественно за счет выделения постганглионарными волокнами ацетилхолина, который связывается с мускариновыми рецепторами, обнаруженными на всех типах клеток ПЖ [2, 3]. В связи с этим большинство исследований, посвященных парасимпатической иннервации ПЖ, направлено на выявление холинергических нейронов и нервных волокон.

Классическим маркером холинергических нейронов и нервных волокон служит ацетилхолинэстераза

(AChE) – фермент, участвующий в распаде ацетилхолина до холина и ацетата. На срезах ПЖ выявление AChE проводилось преимущественно гистохимическим методом (определение активности AChE) [9–11].

В современных иммуногистохимических исследованиях для идентификации холинергических нейронов и нервных волокон широко используются антитела к везикулярному транспортеру ацетилхолина (VAChT) – транспортному белку, осуществляющему перенос ацетилхолина в секреторные пузырьки. Методами гибридизации *in situ* экспрессия VAChT выявлена в целом ряде нейронов периферической симпатической и парасимпатической системы [12]. В иммуногистохимических работах показано, что антитела к VAChT маркируют как холинергические окончания, содержащие большое количество маленьких синаптических пузырьков, несущих этот антиген, так и тела нейронов, где происходит образование секреторных пузырьков [13, 14].

В ПЖ млекопитающих (мышь, овца, кролик) большинство нейронов парасимпатических интрамуральных ганглиев содержит AChE или VAChT, то есть представляет собой холинергические нейроны [10, 15, 16]. Холинергические нервные окончания обнаружены на гладкомышечных клетках сосудов, вблизи протоков и ацинарных клеток, а также в панкреатических островках [10, 15–18]. Тем не менее их распределение в ПЖ у разных видов существенно отличается. Например,

для курицы [9] и овцы [16] характерно преобладание холинергических волокон в экзокринной части железы. Напротив, в ПЖ мышей плотность холинергических волокон в панкреатических островках значительно выше, чем в экзокринной части; холинергические волокна выявляются в центральной области островков и иннервируют как В-, так и А-клетки [17].

Иннервация ПЖ человека, в том числе парасимпатическая, развита заметно слабее, чем у мышей [17, 18]. У взрослых людей холинергические окончания преобладают в экзокринной части ПЖ [17]. Кроме того, холинергические волокна выявляются вокруг нейронов интрамуральных ганглиев [18] и формируют периваскулярные нервные сплетения [11]. В составе эндокринной части ПЖ холинергические волокна выявляются редко [17, 18]. В гистохимическом исследовании показано, что тонкие холинергические волокна образуют сплетения на периферии панкреатических островков, при этом внутрь островка проникают лишь отдельные волокна [11]. Позднее, методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии, установлено, что в панкреатических островках людей присутствуют лишь редкие холинергические волокна, которые располагаются в дискретных регионах и не контактируют с большинством эндокринных клеток [17]. Впрочем, отдельные холинергические волокна обнаружены вблизи А-клеток, на расстоянии, не превышающем 50 мкм [18].

В период внутриутробного развития ПЖ человека иннервирована обильнее, чем у взрослых [19, 20]. Нервный аппарат ПЖ плодов представлен пучками нервных волокон разного диаметра, сетью тонких нервных волокон и интрамуральными ганглиями [19–21]. Кроме того, в ПЖ плодов выявляются комплексы, образованные структурами нервной системы – нейронами и нервными волокнами и эндокринными клетками (нейроинсулярные комплексы) [19, 20]. Однако предыдущие иммуногистохимические исследования, посвященные пренатальному развитию иннервации ПЖ человека, выполнены с применением различных структурных и функциональных маркеров, таких как S100, NSE, нейронспецифический бета-3 тубулин, SNAP-25 и т.д. [19–21]. Данные о распределении структур симпатической и парасимпатической нервной систем в развивающейся ПЖ человека в литературе отсутствуют.

Цель нашей работы – определить возможность использования маркеров холинергических нейронов и нервных волокон (VAcHT и AChE) для исследования пренатального развития парасимпатической иннервации ПЖ человека.

### Материалы и методы

Работа выполнена на 10 аутопсиях ПЖ плодов, гестационный возраст 14–34 недели. Возраст плодов определен по клиническим данным и представлен в неделях от даты последнего менструального цикла.

Фрагменты из тела ПЖ фиксировали в нейтральном формалине (4% формальдегид на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5). Фиксированные образцы ПЖ обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане, заливали в гистомикс («Биовитрум», Санкт-Петербург, Россия) и готовили серийные срезы толщиной 5–7 мкм.

При проведении иммуногистохимических реакций срезы депарафинировали, гидратировали, проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы, демаскирование антигенов и блокировку неспецифического связывания, а затем инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при температуре +37°C. В качестве первичных антител применяли мышинные моноклональные антитела к VAcHT (Sigma, МО, США, Cat.#SAB5200240; 1:50–1:100), кроличьи поликлональные антитела к VAcHT (N-terminal) (Sigma, МО, США, Cat.#SAB4200560; 1:100–1:200), кроличьи поликлональные антитела к AChE (GeneTex, CA, США, Cat.#GTX101648; 1:100–1:500). Демаскирование антигенов проводили кипячением срезов в 0,01М цитратном буфере, pH 6,0, в микроволновой печи в течение 10 минут с последующим остыванием срезов (20 минут). Для блокировки активности эндогенной пероксидазы, блокировки неспецифического связывания и визуализации реакций использовали реактивы из набора UltraVision ONE Detection System (Thermo Fisher Scientific Inc., CA, США, Cat.#TL-015-HDJ) согласно спецификации. Негативным контролем служили реакции, в которых первичные антитела заменяли 0,01М фосфатным буфером.

### Результаты

Во всех исследованных образцах ПЖ в структурах нервной системы наблюдалась иммунопозитивная реакция с антителами к AChE (рис. 1). Иммунореактивность к этому маркеру локализована преимущественно в нервных волокнах, как входящих в состав нервных пучков разного диаметра, так и в одиночных (рис. 1 А). В интрамуральных ганглиях антителами к AChE маркировались преимущественно тонкие нервные волокна, расположенные вокруг нейронов. Слабая иммунопозитивная реакция на AChE наблюдалась в цитоплазме отдельных нейронов (рис. 1 В). В большинстве нейронов интрамуральных ганглиев реакция на AChE была иммунонегативной.

Распределение AChE-содержащих нервных волокон в ткани ПЖ на исследованных сроках развития было сходным. Пучки AChE-содержащих нервных волокон разного диаметра выявлены в междольковой соединительной ткани, где они проходили самостоятельно или сопровождали кровеносные сосуды (рис. 1 А). Тонкие AChE-содержащие волокна присутствовали преимущественно в экзокринной части ПЖ: в междольковой соединительной ткани, вблизи выводных протоков и внутри формирующихся долек (рис. 1 А). В стенке кровеносных сосудов тонкие AChE-содержащие волокна выявлялись редко. Немногочисленные тонкие AChE-содержащие волокна обнаружены в панкреатических

островках, расположенных отдельно (рис. 1 В), а также в панкреатических островках, интегрированных с ганглионарными нейронами в нейроинсулярные комплексы I типа (рис. 1 С). В составе панкреатических островков тонкие АСhE-содержащие нервные волокна были локализованы на периферии и не выявлялись внутри островка между эндокринными клетками (рис. 1 В). В нейроинсулярных комплексах I типа тонкие АСhE-содержащие нервные волокна присутствовали как на периферии островка, так и вокруг ганглионарных нейронов (рис. 1 В).

При маркировании антителами к VАСhТ (мышинными моноклональными и кроличьими поликлональными) реакция в структурах нервной системы была иммунонегативной.

Во всех исследованных образцах ПЖ иммунопозитивная реакция с мышинными моноклональными антителами к VАСhТ обнаружена в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков (рис. 2 А). VАСhТ<sup>+</sup> клетки были локализованы в центральной области панкреатических островков (рис. 2 А). В реакциях с антителами к АСhE эндокринные клетки мар-

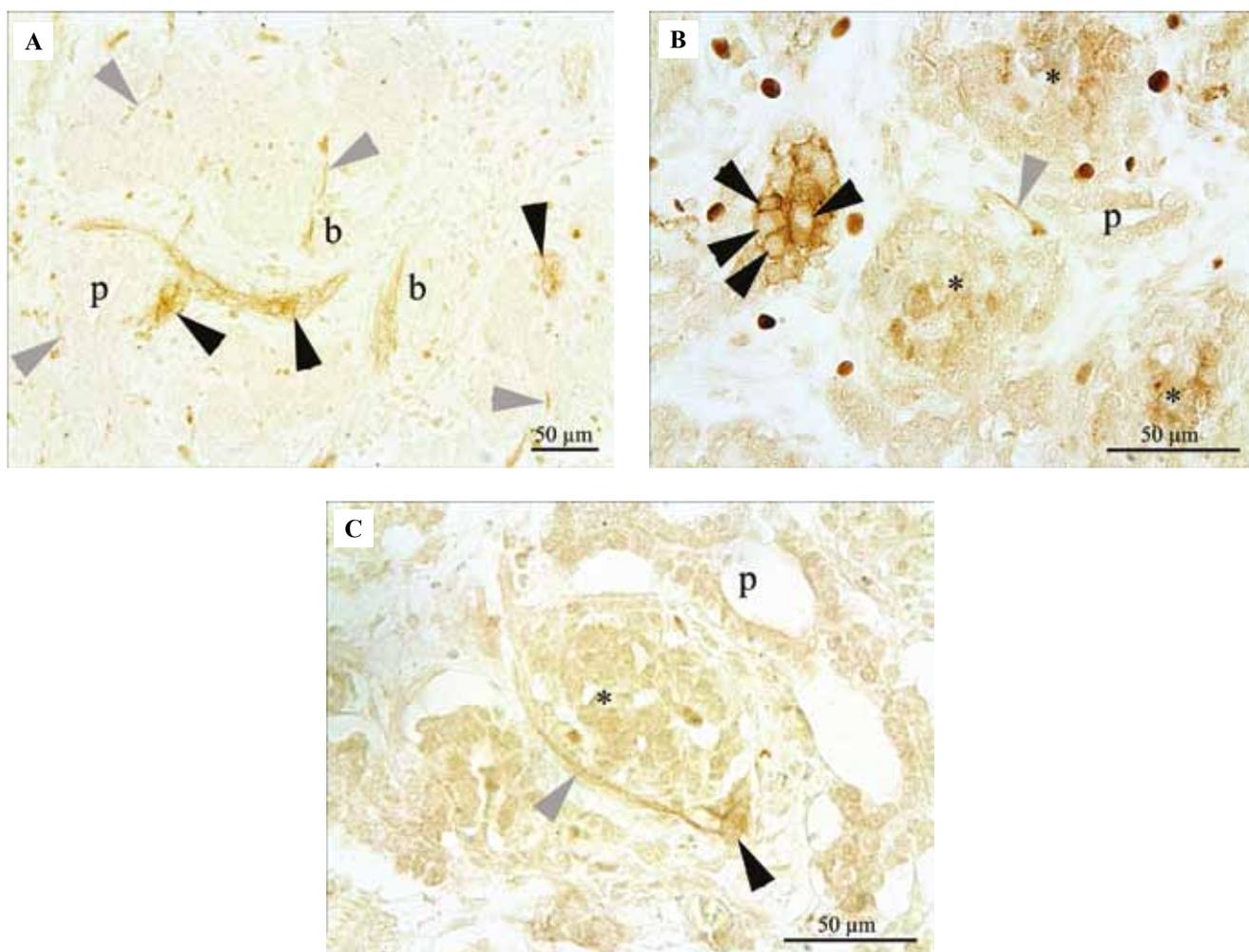


Рис. 1. Поджелудочная железа плодов, гестационный возраст 20 недель (А, В) и 16 недель (С). Иммунопероксидазное маркирование антителами к АСhE.

А – крупные пучки холинергических волокон, интрамуральные ганглии (черные стрелки) и тонкие холинергические волокна (серые стрелки) в экзокринной части железы. В – холинергические нейроны в интрамуральном ганглии (черные стрелки) и тонкое холинергическое волокно (серая стрелка) на периферии панкреатического островка. С – нейроинсулярный комплекс I типа, черной стрелкой указаны ганглионарные нейроны, серой стрелкой – тонкое холинергическое волокно на периферии панкреатического островка

\* – панкреатические островки, b – кровеносные сосуды, p – крупные панкреатические протоки

Fig. 1. Human fetal pancreas, gestational age 20 weeks (A, B) and 16 weeks (C). Immunoperoxidase labeling with antibodies to AChE. A – large cholinergic nerve bundles, intrapancreatic ganglia (black arrowheads) and thin cholinergic fibers (grey arrowheads) in the exocrine pancreas. B – cholinergic neurons in the intrapancreatic ganglia (black arrowheads) and thin cholinergic fiber (grey arrowheads) at the periphery of the pancreatic islet. C – neuro-insular complex type 1, black arrowhead indicates ganglionic neurons, grey arrowhead – thin cholinergic fiber at the periphery of the islet.

\* – pancreatic islets, b – blood vessels, p – pancreatic ducts

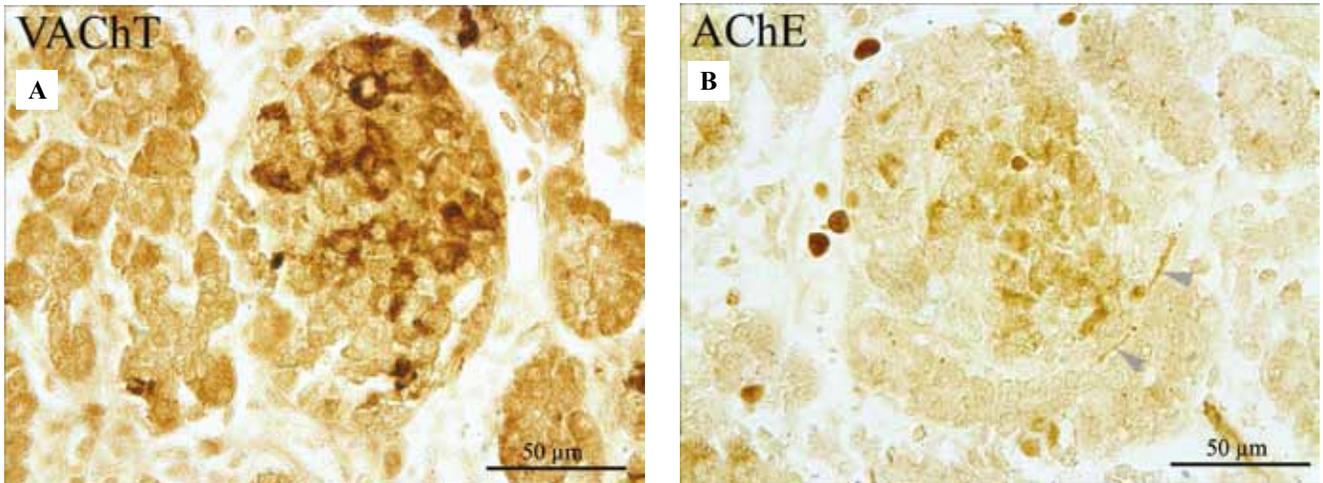


Рис. 2. Клетки, содержащие везикулярный транспортер ацетилхолина (VACht) (А) и ацетилхолинэстеразу (AChE) (В) в панкреатических островках плодов.

А – поджелудочная железа плода, гестационный возраст 32–34 недели, иммунопероксидазное маркирование антителами к VACht. В – поджелудочная железа плода, гестационный возраст 20 недель, иммунопероксидазное маркирование антителами к AChE, серыми стрелками отмечены тонкие холинергические волокна на периферии панкреатического островка

Fig. 2. VACht- and AChE-containing cells in the fetal pancreatic islets.

A – fetal pancreas, gestational age 32–34 weeks, immunoperoxidase labeling with antibodies to VACht. B – fetal pancreas, gestational age 20 weeks, immunoperoxidase labeling with antibodies to AChE, grey arrowheads indicate thin cholinergic fibers at the periphery of the islet

кировались только при использовании концентрации антител 0,0073 мг/мл (рабочее разведение антител 1:100) (рис. 2 В). Как и в реакциях с VACht, AChE<sup>+</sup> клетки располагались преимущественно в центральной части островков (рис. 2 В).

### Обсуждение

Проанализирована возможность использования антител к VACht и AChE для исследования парасимпатической иннервации ПЖ человека в период пренатального развития. Установлено, что антитела к AChE позволяют выявить в развивающейся ПЖ человека пучки нервных волокон разного диаметра, сеть тонких нервных волокон, а также отдельные нейроны интрамуральных ганглиев. При этом реакция с антителами к VACht в структурах нервной системы ПЖ плодов была иммунонегативной. Ранее антитела к VACht успешно применялись для выявления холинергических нейронов и нервных волокон в работах на образцах ПЖ мышей [15, 17], овцы [16] и человека [17, 18]. Отсутствие реакции с антителами к VACht в ПЖ плодов может быть обусловлено низкой специфичностью использованных антител, особенностями фиксации и методики приготовления срезов, невысоким содержанием антигена в структурах нервной системы в период внутриутробного развития и рядом других причин.

При анализе распределения холинергических волокон показано, что на исследованных сроках развития (14–34 недели) тонкие холинергические волокна преобладают в экзокринной части ПЖ: в соединитель-

ной ткани между формирующимися дольками, вблизи протоков и внутри ацинусов, что характерно и для взрослых людей [17]. Кроме того, в ПЖ плодов, как и у взрослых людей [18], тонкие холинергические волокна присутствуют вокруг тел нейронов в интрамуральных ганглиях. Однако в развивающейся ПЖ человека нами не выявлены периваскулярные сплетения холинергических нервных волокон, описанные у взрослых [11]. Мы предполагаем, что формирование этих сплетений происходит на более поздних сроках развития (после 34-й недели) или в постнатальный период. Нами установлено, что в ПЖ плодов тонкие холинергические волокна присутствуют на периферии отдельных панкреатических островков и нейроинсулярных комплексов I типа и не выявляются внутри панкреатических островков между эндокринными клетками. Таким образом, в ПЖ человека в пре- и постнатальный период большинство эндокринных клеток не контактирует с холинергическими окончаниями. Предполагают, что у людей автономная регуляция эндокринной секреции, в том числе парасимпатическая, может осуществляться опосредованно через воздействие на тонус сосудов и изменение локального кровотока в микроциркуляторном русле островков, за счет выделения нейромедиаторов и их диффузии к эндокринным клеткам и/или за счет проникновения нейромедиаторов в локальный кровоток [17, 18].

При использовании антител к AChE нам впервые удалось обнаружить отдельные холинергические ней-

роны в интрамуральных ганглиях развивающейся ПЖ человека. В то же время в большинстве нейронов интрамуральных ганглиев наблюдалась иммунонегативная реакция на АСнЕ, что может быть обусловлено незрелостью нейронов и низким содержанием данного антигена. Не исключено также, что нейроны интрамуральных ганглиев могут синтезировать другие нейромедиаторы (VIP, GRP и PACAP и т.д.), как это было показано в работах на млекопитающих [10, 16].

Нами установлено, что иммунореактивность к VACHT и АСнЕ наблюдается в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков. VACHT- и АСнЕ-содержащие клетки располагались в центральной области панкреатических островков, что соответствует по локализации В-клеткам. Тем не менее для уточнения природы этих клеток необходимы дальнейшие исследования. Ранее экспрессия VACHT и холинацетилтрансферазы (ChAT) была обнаружена в А-клетках панкреатических островков взрослых людей [17, 22]. Эти данные и полученные нами результаты свидетельствуют о том, что эндокринные клетки панкреатических островков могут служить источником ацетилхолина.

### Заключение

Установлено, что антитела к АСнЕ позволяют выявить в развивающейся поджелудочной железе человека пучки нервных волокон различного диаметра, сеть тонких нервных волокон и отдельные нейроны в составе интрамуральных ганглиев. Показано, что распределение холинергических волокон в поджелудочной железе плодов сходно с таковым у взрослых людей. Холинергические волокна преобладают в экзокринной части железы, в междольковой соединительной ткани, вблизи протоков и проникают в ацинусы. В отдельных панкреатических островках и нейроинсулярных комплексах I типа холинергические волокна проходят по периферии. В панкреатических островках плодов, в цитоплазме части эндокринных клеток выявлена иммунорезистивная реакция на АСнЕ и VACHT. Эти результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют о том, что эндокринные клетки могут служить источником ацетилхолина.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Ю.С. Кривова, А.Е. Прошина, С.В. Савельев.  
Сбор и обработка материала – Ю.С. Кривова, Д.А. Отлыга.  
Написание текста – Ю.С. Кривова.  
Редактирование – Ю.С. Кривова, А.Е. Прошина, Д.А. Отлыга, С.В. Савельев.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, S.V. Saveliev.  
Collected the data and performed the analysis – Y.S. Krivova, D.A. Otylga.  
Wrote the paper – Y.S. Krivova.  
Edited the manuscript – Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, D.A. Otylga, S.V. Saveliev.

### Литература/References

1. *Ahrén B.* Autonomic regulation of islet hormone secretion – Implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43(4):393–410. DOI: 10.1007/s001250051322.
2. *Gilon P, Henquin JC.* Mechanism and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic b-cell function. *Endocr Rev*. 2001;22(5):565–604. DOI: 10.1210/edrv.22.5.0440.
3. *Kiba T.* Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas*. 2004;29(2):e51–8. DOI: 10.1097/00006676-200408000-00019.
4. *Konturek SJ, Zabielski R, Konturek JW, Czarnecki J.* Neuroendocrinology of the pancreas; role of brain-gut axis in pancreatic secretion. *Eur J Pharmacol*. 2003;481(1):1–14. DOI: 10.1016/j.ejphar.2003.08.042.
5. *Edvell A, Lindstrom P.* Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am J Physiol*. 1998;274(6):E1034–E1039. DOI: 10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1034.
6. *Lausier J, Diaz WC, Roskens V, LaRock K, Herzer K, Fong CG et al.* Vagal control of pancreatic beta-cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E786–E793. DOI: 10.1152/ajpendo.00202.2010.
7. *Mundinger TO, Mei Q, Foulis AK, Fligner CL, Hull RL, Taborsky GJ Jr.* Human type 1 diabetes is characterized by an early, marked, sustained and islet-selective loss of sympathetic nerves. *Diabetes*. 2016;65(8) 2322–30. DOI: 10.2337/db16-0284.
8. *Lundberg M, Lindqvist A, Wierup N, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Skog O.* The density of parasympathetic axons is reduced in the exocrine pancreas of individuals recently diagnosed with type 1 diabetes. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179911. DOI: 10.1371/journal.pone.0179911.
9. *Hiramatsu K, Watanabe T, Fujioka T.* The distribution of acetylcholinesterase(AChE)-positive nerves in chicken pancreas demonstrated by light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 1988;51(2):159–68. DOI: 10.1679/aohc.51.159.
10. *Love JA, Szebeni K.* Morphology and histochemistry of the rabbit pancreatic innervation. *Pancreas*. 1999;18(1):53–64. DOI: 10.1097/00006676-199901000-00008.
11. *Amenta F, Cavallotti C, de Rossi M, Tonelli F, Vatrella F.* The cholinergic innervation of human pancreatic islets. *Acta Histochem*. 1983;73(2):273–8. DOI: 10.1016/S0065-1281(83)80038-5.
12. *Schäfer MKH, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE, Erickson JD.* Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Molec Neurosci*. 1994;5(1):1–26. DOI: 10.1007/BF02736691.
13. *Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B.* Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp. Neurol*. 1997;378(4):454–67. DOI 10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<454::AID-CNE2>3.0.CO;2-1.
14. *Schäfer MKH, Weihe E, Erickson JD, Eiden LE.* Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VACHT, the vesicular acetylcholine transporter. *J Molec Neurosci*. 1995;6(4):225–35. DOI: 10.1007/BF02736782.

15. Tang SC, Peng SJ, Chien HJ. Imaging of the islet neural network. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(Suppl 1):77–86. DOI: 10.1111/dom.12342.
16. Arciszewski MB, Zacharko-Siembida A. Cholinergic innervation of the pancreas in the sheep. *Acta Biol Hung.* 2007;58(2):151–61. DOI: 10.1556/ABiol.58.2007.2.2.
17. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO et al. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab.* 2011;14(1):45–54. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.05.008.
18. Tang SC, Baeyens L, Shen CN, Peng SJ, Chien HJ, Scheel DW et al. Human pancreatic neuro-insular network in health and fatty infiltration. *Diabetologia.* 2018;61(1):168–81. DOI: 10.1007/s00125-017-4409-x.
19. Krivova YS, Proshchina AE, Barabanov VM, Saveliev SV. Development of the islets of Langerhans in the human fetal pancreas. In: A. Satou, H. Nakamura (eds.). *Pancreas: Anatomy, diseases and health implications.* Nova Science Publishers, 2012. P. 53–88.
20. Proshchina AE, Krivova YS, Barabanov VM, Saveliev SV. Ontogeny of neuro-insular complexes and islets innervation in the human pancreas. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:57. DOI: 10.3389/fendo.2014.00057.
21. Amella C, Cappello F, Kahl P, Fritsch H, Lozanoff S, Sergi C. Spatial and temporal dynamics of innervation during the development of fetal human pancreas. *Neuroscience.* 2008;154(4):1477–87. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.050.
22. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Facado A, Molina J, Abdulreda M et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming human beta cell function. *Nat Med.* 2012;17(7):888–92. DOI:10.1038/nm.2371.

### Информация об авторах

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

Александра Евгеньевна Прошчина – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Дмитрий Александрович Отлыга – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

### Author information

Yuliya S. Krivova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-9692-3616>

Alexandra E. Proshchina – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0515-8275>

Dmitriy A. Otlyga – Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-6719-3383>

Sergey V. Saveliev – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

## Роль экстрагенитальной инфекционной патологии в структуре материнской смертности г. Москвы

Л.М. Михалева<sup>1,6</sup>, А.Г. Конопляников<sup>2,7</sup>, Я.Ю. Кудрявцева<sup>3</sup>,  
Ю.Г. Пархоменко<sup>1,4</sup>, А.С. Оленев<sup>5</sup>, О.А. Тишкевич<sup>4</sup>, Н.А. Грачева<sup>6</sup>,  
А.Е. Бирюков<sup>1,6</sup>, С.А. Михалев<sup>7</sup>, Е.Н. Сонгорова<sup>8</sup>

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

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

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

<sup>4</sup> ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>5</sup> Перинатальный центр ГБУЗ Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>6</sup> ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>7</sup> ГБУЗ Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>8</sup> ГБУ Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

*Введение.* Заболевания, напрямую не связанные с акушерской патологией и родами, отходят на второй план и не всегда учитываются в структуре материнской смертности, однако их значение трудно переоценить. К особой группе среди таких патологий относят инфекционные заболевания, распространенность которых в разных странах значительно варьирует. Данные заболевания, как правило, характеризуются тяжелым течением и представляют серьезную угрозу жизни как матери, так и ребенка. Наиболее актуальными среди них являются ВИЧ-инфекция, туберкулез, инфекционный эндокардит, сепсис. Цель исследования – рассмотреть основные экстрагенитальные причины материнской смертности и определить место инфекционной патологии на основании данных патологоанатомических вскрытий.

*Материалы и методы.* В исследование вошло 38 секционных наблюдений, более детально рассмотрено 10 случаев, изучены медицинская документация, протоколы вскрытий умерших беременных, рожениц и родильниц. Причины смерти классифицировались по критериям МКБ-10. Было проведено клинико-морфологическое исследование, а также использованы дополнительные лабораторные методы диагностики (микробиологический, гистобактериоскопический, молекулярно-генетический, серологический, цитологический).

*Результаты.* На основании данных патологоанатомических исследований установлено, что в Москве за период с 2013 по 2019 год на долю экстрагенитальной патологии приходится 38 летальных случаев материнской смерти (46,9% от всех наблюдений), из них 10 (26,3%) наблюдений – на инфекционную патологию.

*Заключение.* Экстрагенитальная патология хотя и не является лидирующей причиной материнской смертности, остается важной акушерской проблемой. Значимое место в структуре экстрагенитальных причин смертности играют инфекционные заболевания, в первую очередь ВИЧ-инфекция.

**Ключевые слова:** материнская смертность, экстрагенитальная инфекционная патология, туберкулез, ВИЧ-инфекция, инфекционный эндокардит, наркомания, саркома Капоши

**Для корреспонденции:** Янина Юрьевна Кудрявцева. E-mail: yan4eg@inbox.ru

**Для цитирования:** Михалева Л.М., Конопляников А.Г., Кудрявцева Я.Ю., Пархоменко Ю.Г., Оленев А.С., Тишкевич О.А., Грачева Н.А., Бирюков А.Е., Михалев С.А., Сонгорова Е.Н. Роль экстрагенитальной инфекционной патологии в структуре материнской смертности г. Москвы. Клин. эксп. морфология. 2020;9(3):34–42. DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.34-42

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

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

Статья поступила 07.04.2020. Получена после рецензирования 06.05.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## The role of extragenital infectious pathology in the structure of maternal mortality in Moscow

L.M. Mikhaleva<sup>1,6</sup>, A.G. Konoplyannikov<sup>2,7</sup>, Y.Y. Kudryavtseva<sup>3</sup>, Y.G. Parhomenko<sup>1,4</sup>, A.S. Olenev<sup>5</sup>,  
O.A. Tishkevich<sup>4</sup>, N.A. Gracheva<sup>6</sup>, A.E. Biryukov<sup>1,6</sup>, S.A. Mikhalev<sup>7</sup>, E.N. Songolova<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

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

<sup>3</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Infectious Clinical Hospital No. 2 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Perinatal Center of the City Clinical Hospital No. 24 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>6</sup> City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>7</sup> Family Planning and Reproduction Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>8</sup> Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

**Introduction.** Diseases that are not directly related to obstetric pathology and childbirth fade into the background and are not always included in the maternal mortality, but their significance can hardly be overestimated. A special group of such pathologies comprises infectious diseases, the prevalence of which varies significantly in different countries. As a rule, these diseases are characterized by a severe course and are life-threatening for the mother and the child. The most relevant among them are HIV infection, tuberculosis, infectious endocarditis, and sepsis. The aim of the study was to consider the leading extragenital causes of maternal mortality and to assess the importance of infectious pathology based on the pathological findings. **Materials and methods.** The study included 38 pathological autopsies, 10 of which are described in more detail. Medical documentation, autopsy protocols for deceased pregnant women, women in labor, and women in childbirth were examined. Causes of death were classified according to the ICD-10 criteria. A clinical and morphological study was carried out, and supportive laboratory techniques were used (microbiological, histobacterioscopic, molecular genetic, serological, and cytological tests).

**Results.** As it follows from the autopsy report data from 2013 to 2019 in Moscow, the extragenital pathology accounted for 38 lethal cases (46.9% of all maternal deaths), of which 10 (26.3%) cases were associated with infectious pathology.

**Conclusion.** Extragenital pathology, although not a leading cause of maternal mortality, remains a crucial obstetric problem. Infectious diseases, primarily HIV infection, are the significant cause of extragenital morbidity.

**Keywords:** maternal mortality, extragenital infectious pathology, tuberculosis, HIV infection, infectious endocarditis, drug addiction, Kaposi's sarcoma

**Corresponding author:** Yanina Y. Kudryavtseva. E-mail: yan4eg@inbox.ru

**For citation:** Mikhaleva L.M., Konoplyannikov A.G., Kudryavtseva Y.Y., Parhomenko Y.G., Olenev A.S., Tishkevich O.A., Gracheva N.A., Biryukov A.E., Mikhalev S.A., Songolova E.N. The role of extragenital infectious pathology in the structure of maternal mortality in Moscow. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(3):34–42 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.34-42

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

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

**Received** 07.04.2020. **Received in revised form** 06.05.2020. **Accepted** 14.05.2020.

### Введение

Комплексный анализ, проведенный ВОЗ и американским Институтом показателей и оценки здоровья, выявил возрастающее значение косвенных причин в структуре материнской смертности в начале XXI века [1, 2]. Под косвенными (непрямыми, экстрагенитальными) причинами смерти принято понимать летальные исходы среди беременных в результате существовавшей прежде болезни или болезни, развившейся в период беременности, вне связи с непосредственной акушерской причиной, но отягощенной физиологическим воздействием беременности [3]. Данная группа заболеваний зачастую уходит на второй план при учете рисков осложнения беременности, уступая место акушерской патологии. Предшествующие заболевания весьма распространены среди беременных,

в особую группу попадают инфекционные болезни, оказывающие негативное влияние на течение беременности и родов, а в отдельных случаях приводящие к летальному исходу. Особую опасность они представляют в связи с возможностью трансплацентарной передачи патогена, что ставит под угрозу жизнь не только матери, но и плода.

Доля смертей, вызванных косвенными причинами, в некоторых странах мира превышает 50% [4]. Во многом этому способствует пандемия ВИЧ-инфекции в южноафриканском регионе [5]. ВИЧ-инфицирование является наиболее распространенным инфекционным заболеванием, которое может осложнить течение беременности: около 17 миллионов женщин во всем мире живут с ВИЧ. В 2010 году причины, ассоциированные с этим вирусом, унесли жизнь от

19 000 до 56 000 беременных, рожениц и родильниц, что составило от 6 до 20% материнских смертей во всем мире [6, 7].

Среди наиболее распространенных причин смертности среди ВИЧ-инфицированных беременных женщин выделяют СПИД, туберкулез, малярию и пневмонию. Беременность, по-видимому, не ускоряет прогрессирование течения ВИЧ-инфекции. Хотя некоторые исследования, посвященные этой проблеме, базируются на данных из стран с высоким уровнем дохода, где у женщин была возможность получать различные варианты лечения [8], исследования из стран с низким уровнем дохода, в которых не было доступной терапии, сообщают о сходных результатах. Однако существует предположение, что беременность (или, возможно, грудное вскармливание) может ускорить прогрессирование заболевания после родов. Также нет данных о повышенном риске смерти среди ВИЧ-инфицированных беременных женщин по сравнению с ВИЧ-положительными небеременными [9]. ВИЧ-инфицированные беременные женщины, как правило, более внимательно относятся к собственному здоровью, в том числе в период планирования беременности, что отражается в более низких показателях смертности по сравнению с небеременными ВИЧ-положительными женщинами [10].

Широкое распространение в эндемичных районах туберкулеза и в особенности снижение возрастной медианы дебюта заболевания объясняют широкое распространение данного заболевания среди женщин детородного возраста и, соответственно, беременных.

Во время беременности происходят физиологические и иммунологические изменения, которые оказывают влияние на восприимчивость организма к инфекционным патогенам. Легочные и сердечные физиологические отклонения могут способствовать повышенному риску респираторных заболеваний, а специфика иммунного статуса во время беременности повысить восприимчивость к некоторым инфекциям.

## Материалы и методы

Проанализированы все случаи материнской смертности от экстрагенитальной патологии в Москве за период с 2013 по 2019 год, вскрытия которых были проведены в патологоанатомических отделениях на базе инфекционной клинической больницы № 2 ДЗМ и городской клинической больницы № 31 ДЗМ. В наше исследование были включены 38 беременных, рожениц и родильниц, умерших от экстрагенитальной патологии. В данной статье также рассмотрены 10 случаев материнской смертности от инфекционных заболеваний. Средний возраст умерших беременных, включенных в исследование, составил 31 год (от 21 года до 42 лет). На основании изученных клинических сведений (соматический анамнез, история ведения беременности и родов), лабораторных методов диагностики (микробиологический, гистобактериоскопический, молеку-

лярно-генетический, серологический, цитологический) и физикально-инструментальных данных проведен клиничко-морфологический анализ с использованием дополнительного окрашивания (цитологическое окрашивание по Цилю–Нильсену, Романовскому–Гимзе, окрашивание по Граму, по ван Гизону, ШИК-реакция в сочетании с альциановым синим). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей.

## Результаты и обсуждение

В период с 2013 по 2019 год в Москве, по данным ДЗМ, от экстрагенитальной патологии умерли 38 беременных, рожениц и родильниц, что составило 46,9% от всех случаев материнской смертности. Из них 28 летальных случаев обусловлены неинфекционной экстрагенитальной патологией. В указанной группе лидирующее место занимают болезни системы кровообращения, в которой были выявлены артериовенозная мальформация, аневризма сосудов головного мозга, пороки сердца, инфаркт миокарда, а также аневризма аорты и селезеночной артерии (O99.4; 14 случаев, 36,8%). На втором месте – заболевания инфекционной природы, доля которых составляет 26,3% (O98.0–O98.8; 10 наблюдений). Третье место занимают другие уточненные заболевания и состояния, осложняющие беременность, в эту группу вошли злокачественные образования (O99.8; шесть случаев, 15,8%), следом за которыми расположены заболевания пищеварительной системы (O99.6; четыре наблюдения, 10,5%). Реже встречались заболевания крови и кроветворных органов, а также отдельные нарушения, связанные с иммунным статусом, осложненные беременностью (O99.1), и заболевания органов дыхания (O99.5) – по два случая (5,3%) (рис. 1).

Среди инфекционных заболеваний, приведших у беременных к летальному исходу, преобладала коморбидная патология с наличием в анамнезе ВИЧ-инфекции. По одному случаю из группы инфекционных патологий приходится на генерализованный туберкулез и другие вирусные болезни.

## Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека, осложняющая беременность, роды и послеродовой период (O98.7)

Беременность называют иммунологическим и биологическим парадоксом, поскольку иммунная система не только не отторгает наполовину чужеродный для матери организм, но и допускает сосуществование двух разных типов тканей. Эту возможность обеспечивает изменение вектора взаимодействия системы эфферентных Т-лимфоцитов. В результате профиль влияния клеточного иммунного ответа, контролируемый Th1 лимфоцитами, смещается в пользу усиления влияния регуляторных клеток-хелперов Th2. Таким образом, беременность является состоянием повышенного врожденного иммунного ответа при сниженном

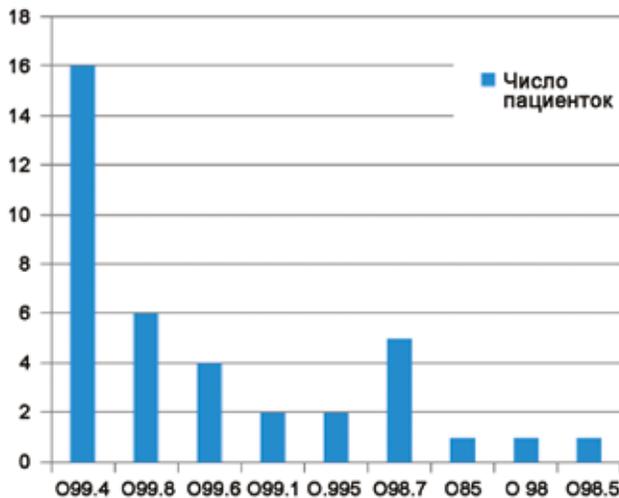


Рис. 1. Распределение умерших от экстрагенитальных причин, включая инфекционную этиологию. O99.4 – Болезни системы кровообращения, включая два случая инфекционного эндокардита; O99.8 – Уточненные заболевания и состояния, осложняющие беременность; O99.6 – Заболевания пищеварительной системы; O99.1 – Заболевания крови и кроветворных органов, а также отдельные нарушения, связанные с иммунным статусом, осложненные беременностью; O99.5 – Заболевания органов дыхания; O98.7 – Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека [ВИЧ], осложняющая беременность, роды и послеродовой период; O85 – Послеродовой сепсис; O98.0 – Туберкулез, осложняющий беременность, деторождение или послеродовой период; O98.5 – Другие вирусные болезни, осложняющие беременность, деторождение или послеродовой период

Fig. 1. Distribution of the extragenital causes of death in maternal mortality, including infections. O99.4 – Diseases of the circulatory system complicating pregnancy, childbirth and the puerperium, including two cases of infective endocarditis; O99.8 – Other specified diseases and conditions complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O99.6 – Diseases of the digestive system complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O99.1 – Other diseases of the blood and blood-forming organs and certain disorders involving the immune mechanism complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O99.5 – Diseases of the respiratory system complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O98.7 – Human immunodeficiency virus [HIV] disease complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O85 – Puerperal sepsis; O98.0 – Tuberculosis complicating pregnancy, childbirth and the puerperium; O98.5 – Other viral diseases complicating pregnancy, childbirth and the puerperium

клеточном [11]. Активация лимфоцитов происходит за счет экспрессии на их поверхности гликопротеиновых корецепторов. Для клеток Th1 это CD8, для клеток Th2 – CD4. Ответ, обусловленный регуляторными клетками, прежде всего CD4 лимфоцитами, способствует развитию иммунной совместимости организ-

мов матери и плода. Согласно Heffron et al. (2014), у ВИЧ-инфицированных беременных число CD4 клеток ниже, чем вне беременности, и повышается после родов [12]. Представленные результаты свидетельствуют, что на этапе клинических проявлений ВИЧ-инфекции с нарастающим дефицитом регуляторных лимфоцитов беременность крайне нежелательна и вероятность ее вынашивания будет снижена.

После того как в клиническую практику была внедрена антиретровирусная терапия (АРТ), специфичная для лечения ВИЧ-инфекции, продолжительность жизни пациентов увеличилась и заболевание было отнесено к группе управляемых хронических инфекций [13]. Появились пациенты с соматической патологией, при которой следует учитывать поражение вирусом иммунодефицита человека не только иммунной системы, но и других органов и систем [14]. Наиболее частыми вторичными заболеваниями для ВИЧ-инфекции являются туберкулез, пневмонии различной этиологии, онкологические заболевания, оппортунистические, грибковые и бактериальные инфекции. В нескольких исследованиях была продемонстрирована высокая частота встречаемости ВИЧ-инфекции среди случаев материнской смертности, связанных с туберкулезом. Коинфекция с туберкулезом при наличии ВИЧ-инфицирования особенно вредна тем, что увеличивает риск реактивации туберкулеза, а его наличие может вызывать уменьшение числа клеток CD4 и увеличение репликации вируса [15]. У беременных женщин, инфицированных ВИЧ и *Mycobacterium tuberculosis*, риск смерти в 2–3 раза выше по сравнению с беременными, инфицированными только *M. tuberculosis* [16]. ВИЧ-инфекция служит фактором риска развития нескольких злокачественных онкологических заболеваний. По сравнению с общей популяцией у ВИЧ-инфицированных риск заболеть саркомой Капоши выше в 3640 раз и в 300 раз больше, чем среди пациентов с иммунодефицитом, вызванным другими причинами [17]. Полагают, что в основе механизма развития саркомы Капоши лежит повышение продукции цитокинов, регулирующих процессы ангиогенеза и лимфангиогенеза, обусловленное действием ВИЧ [18].

В нашем исследовании у пяти умерших беременных была диагностирована ВИЧ-инфекция в качестве основной причины смерти: в четырех наблюдениях вирус иммунодефицита явился основным заболеванием, а в одном случае ВИЧ-инфекция конкурировала с инфекционным эндокардитом. Во всех пяти случаях диагноз подтвержден методом вестерн-блоттинга. К моменту наступления летального исхода все беременные достигли терминальной стадии заболевания (4B), которая в числе прочего была подтверждена снижением общего числа CD4 лимфоцитов, а согласно клиническим данным, анамнез умерших был отягощен наркотической зависимостью. Лишь в одном наблюдении из пяти женщина получала антиретровирусную терапию. Четыре наблюдения протекали с наличием вторичных заболе-

ваний – диссеминированного туберкулеза (подтверждено посмертным ПЦР исследованием и гистобактериоскопически), полисегментарной фибринозно-гнойной пневмонии (бактериологический анализ легких, при посеве выделены *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Clebsiella*, *Enterococcus facium*), генерализованной саркомы Капоши с бактериально-грибковой пневмо-

нией (бактериологический анализ легких – *Klebsiella*, *Candida*). Наиболее тяжелый случай характеризовался наличием ВИЧ-инфекции 4В стадии с вторичным генерализованным криптококкозом (РЛА с *Cryptococcus*, ПЦР ликвора – ДНК *Cryptococcus*), пневмоцистной пневмонией, генерализованным туберкулезом, цитомегаловирусной инфекцией (рис. 2).

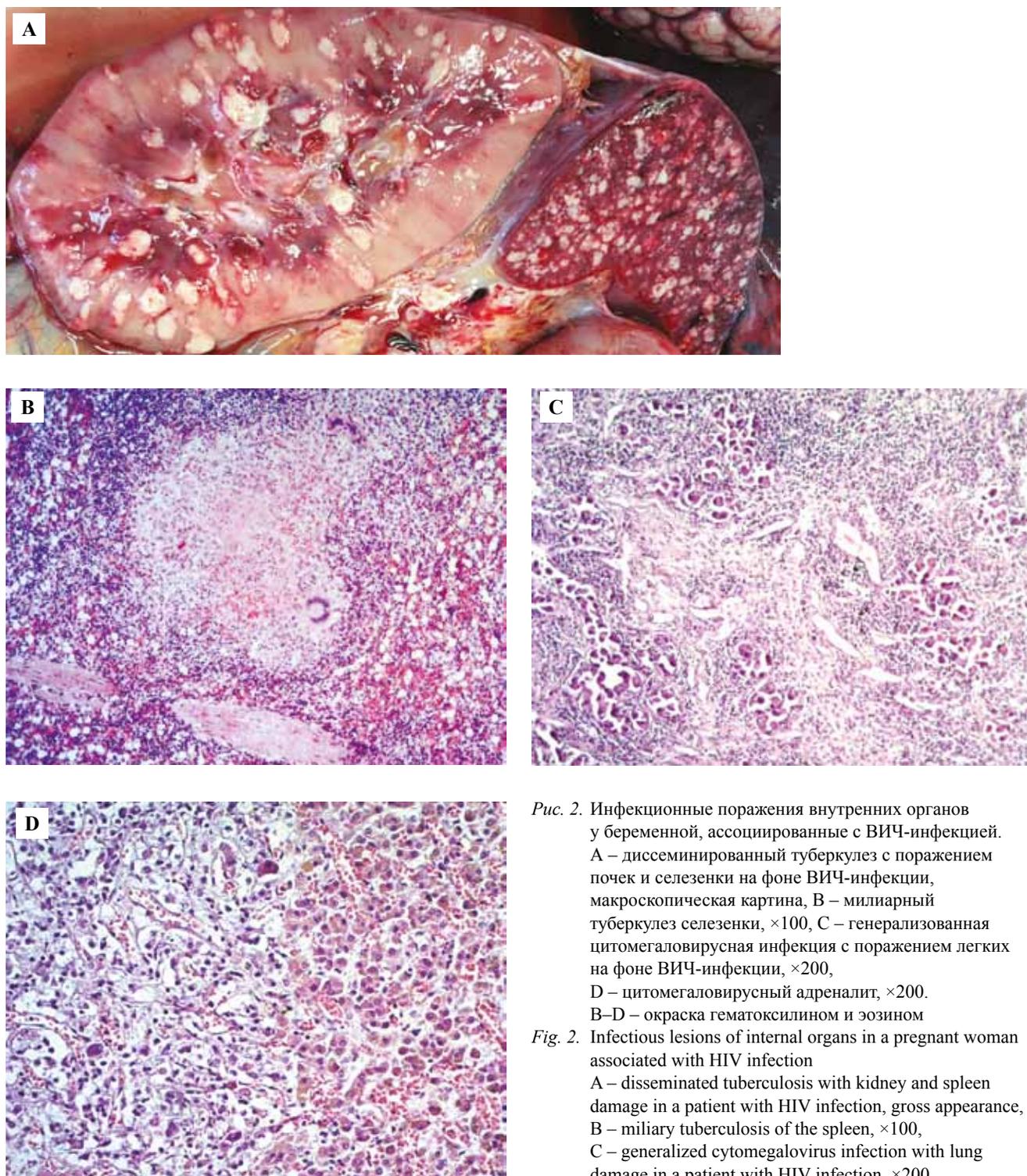


Рис. 2. Инфекционные поражения внутренних органов у беременной, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией. А – диссеминированный туберкулез с поражением почек и селезенки на фоне ВИЧ-инфекции, макроскопическая картина, В – милиарный туберкулез селезенки,  $\times 100$ , С – генерализованная цитомегаловирусная инфекция с поражением легких на фоне ВИЧ-инфекции,  $\times 200$ , D – цитомегаловирусный адреналит,  $\times 200$ .

Fig. 2. Infectious lesions of internal organs in a pregnant woman associated with HIV infection  
A – disseminated tuberculosis with kidney and spleen damage in a patient with HIV infection, gross appearance, B – miliary tuberculosis of the spleen,  $\times 100$ , C – generalized cytomegalovirus infection with lung damage in a patient with HIV infection,  $\times 200$ , D – cytomegalovirus adrenalitis,  $\times 200$ . B–D – H&E stain

### Другие инфекционные и паразитарные болезни матери, осложняющие беременность, деторождение или послеродовой период (O98.8)

ВИЧ-инфекция не всегда может выступать в качестве основной патологии, многие заболевания, как, в частности, инфекционный эндокардит (ИЭ) и сепсис, протекают на фоне инфицирования вирусом иммунодефицита. Заболеваемость беременных женщин ИЭ, по разным данным, не превышает 0,006% [19]. Предсуществующий клапанный порок, а также наркомания значительно повышают риск развития ИЭ [20]. Иммунодефицитное состояние не может не оказывать влияние на течение тяжелой бактериальной инфекции, такой как ИЭ. Существует определенная общность органических поражений, например легких, сходство гематологических изменений при двух этих заболеваниях, что может стать причиной взаимного отягощения симптомов и ухудшения прогноза [21, 22].

Течение ИЭ на фоне ВИЧ/СПИДа у наркоманов, вводящих психоактивные вещества инъекционно, в целом характеризуется теми же признаками, что и у тех, кто вводит наркотики внутривенно, без ВИЧ-инфекции: правосторонняя локализация, преимущественно стафилококковая этиология, наличие респираторных симптомов. Отличительными особенностями ИЭ у данной категории пациентов являются большая тяжесть поражения легких, его диссеминированный характер [23].

В нашей работе в двух наблюдениях ВИЧ-инфекция послужила фоновым заболеванием для развития ИЭ, а еще в одном – для сепсиса (рис. 3). Во всех этих наблюдениях анамнез был отягощен наркоманией. Диагноз «инфекционный эндокардит» подтвержден бактериологически, в обоих случаях обнаружена контаминация *Staphylococcus aureus*. На секции были выявлены признаки септикопиемии с поражением сердца, легких, головного мозга, почек, матки, селезенки, а также развернутая картина ДВС-синдрома. Другой клинический случай, протекавший на фоне подтвержденной ВИЧ-инфекции и внутривенного введения наркотиков, охарактеризовался развитием бактериально-грибкового сепсиса (при бактериологическом исследовании – *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida*), входными воротами для которого послужила постинъекционная гематома мягких тканей правого бедра. Данный случай также осложнился развитием ДВС-синдрома.

### Туберкулез, осложняющий беременность, деторождение или послеродовой период (O98.0)

Туберкулез продолжает оставаться одной из основных причин заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний во всем мире [24]. В настоящее время туберкулез является причиной почти 1,8 миллиона случаев смерти в год, вызванных эпидемией ВИЧ, особенно в странах Африки к югу от Сахары. Примерно треть смертей от туберкулеза приходится на женщин

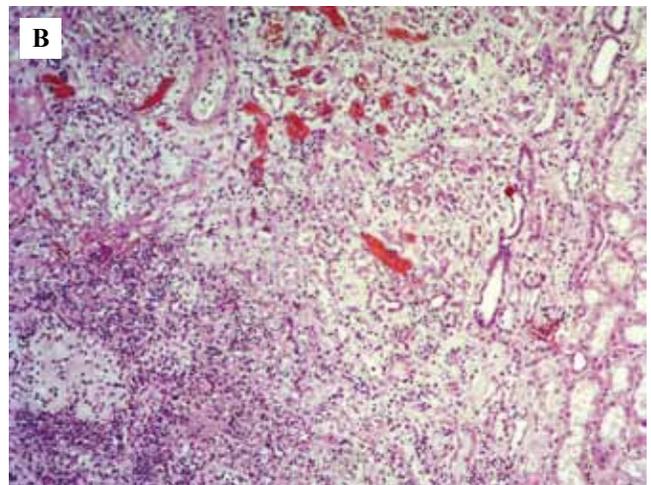
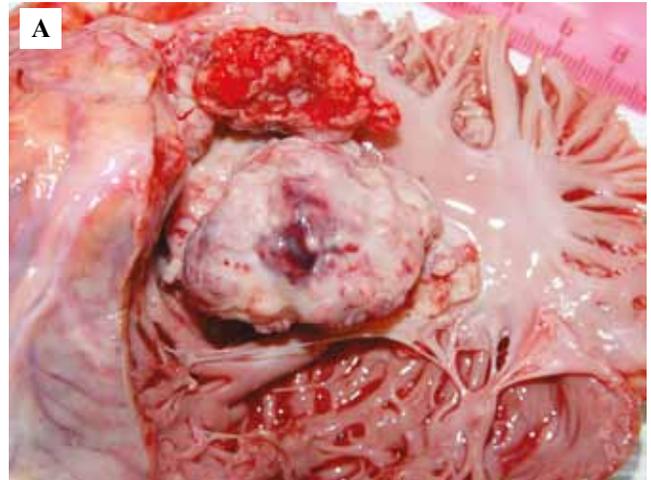


Рис. 3. Септические осложнения у беременных пациенток с ВИЧ-инфекцией.

А – инфекционный эндокардит митрального клапана, В – апостематозный нефрит при септикопиемии. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 3. Septic complications HIV infection in a pregnant woman  
А – infectious endocarditis of the mitral valve,  
В – suppurative nephritis in septicopyemia.  
H&E stain,  $\times 200$

детородного возраста. Одной из причин высокой смертности может быть отсутствие проведения скрининга на туберкулез, что способствует поздней диагностике и развитию запущенных форм заболевания.

С 2013 по 2019 год, по нашим данным, было зарегистрировано лишь одно наблюдение летального исхода у беременной от генерализованной формы туберкулеза с поражением обоих легких, внутригрудных лимфатических узлов, подвздошной кишки (прижизненно выявлены антитела к *Mycobacterium tuberculosis*, кислотоустойчивые бактерии в бронхиальном смыве). Следует отметить, что основное заболевание протекало в сочетании с врожденной гигантской кистой легкого, что впоследствии осложнилось развитием легочного кровотечения (рис. 4).

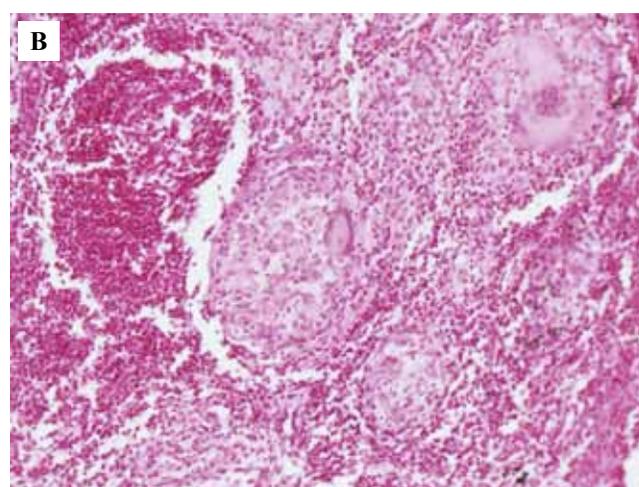


Рис. 4. Генерализованная форма туберкулеза у беременной.

А – милиарный туберкулез легких, В – туберкулезный лимфаденит. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 4. Generalized form of tuberculosis in a pregnant woman

А – miliary tuberculosis of the lungs, В – tuberculous lymphadenitis. H&E stain,  $\times 200$

### Другие вирусные болезни, осложняющие беременность, деторождение или послеродовой период (O98.5)

Точное определение частоты встречаемости летальных исходов, вызванных вирусными агентами, – сложная задача. Большинство смертельных случаев происходит в регионах с ограниченным эпидемиологическим надзором, а отсутствие молекулярной диагностики значительно затрудняет постановку диагноза [25].

В нашем исследовании смерть беременной от вирусной инфекции встретилась лишь один раз. После проведенной аутопсии была диагностирована генерализованная вирусная инфекция (по результатам вирусологического исследования выделены аденовирусы и RS-вирусы) с явлениями острого трахеобронхита, диффузного альвеолярного повреждения с геморрагическим синдромом, лимфаденитом. При гистологическом исследовании выявлены фибриновые тромбы в просвете гемомикроциркуляторного русла внутренних органов, множественные кровоизлияния в головном мозге, миокарде, почках, лимфатических узлах.

### Выводы

Инфекционные заболевания занимают важное место в структуре материнской смертности от экстрагенитальной патологии. Подавляющее большинство случаев протекает с наличием ВИЧ-инфекции терминальной стадии и наркомании. Непосредственные причины таких смертей включают инфекционную этиологию, осложнения самой беременности, контекстуальные и структурные барьеры на пути к медицинской помощи. Тем не менее нам известно, что многие из этих смертей можно предотвратить с использованием высококачественной акушерской помощи, профилактики и лечения распространенных сопутствующих инфекций, а также лечения ВИЧ-инфекции с применением антиретровирусной терапии.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, А.Г. Коноплянников, А.С. Оленев.  
Сбор и обработка материала – Ю.Г. Пархоменко, О.А. Тишкевич.  
Написание текста – Я.Ю. Кудрявцева, Н.А. Грачева, А.Е. Бирюков, С.А. Михалев.  
Редактирование – Л.М. Михалева, Е.Н. Сонголова.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, A.G. Konoplyannikov, A.S. Olenev.  
Collected the data and performed the analysis – Y.G. Parhomenko, O.A. Tishkevich.  
Wrote the paper – Y.Y. Kudryavtseva, N.A. Gracheva, A.E. Biryukov, S.A. Mikhalev.  
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, E.N. Songolova.

### Литература/References

1. Say L, Chou D, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(6):323–33. DOI: 10.1016/S2214-109X(14)70227-X.
2. Kassebaum NJ, Bertozzi-Villa A, Coggeshall MS, Shackelford KA, Steiner C, Heuton KR et al. Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9947):980–1004. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60696-6.
3. Э.К. Айламазян, В.И. Кулаков, В.Е. Радзинский, Г.М. Савельева (ред.). Акушерство: Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1200 с. EK Aylamazyan, VI Kulakov, VE Radzinskiy, GM Savel'eva (eds.). *Akusherstvo: Natsional'noe rukovodstvo*. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 1200 p. (In Russ.).
4. Moran NF, Moodley J. The effect of HIV infection on maternal health and mortality. *Int J Gynecol Obstet*. 2012;119(S1):S26–S29. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.03.011.
5. Mumtaz GR, Awad SF, Feizzadeh A, Weiss HA, Abu-Raddad LJ. HIV incidence among people who inject drugs in the Middle

- East and North Africa: mathematical modelling analysis. *J Int AIDS Soc.* 2018;21(3):e25102. DOI: 10.1002/jia2.25102.
6. World Health Organization. Trends in maternal mortality: 1990 to 2010: WHO, UNICEF, UNFPA, and the World Bank estimates. Geneva: WHO; 2012. Available at: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44874/9789241503631\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44874/9789241503631_eng.pdf?sequence=1) (23.07.2020).
  7. Lozano R, Wang H, Foreman KJ, Rajaratnam JK, Naghavi M, Marcus JR et al. Progress towards Millennium Development Goals 4 and 5 on maternal and child mortality: an updated systematic analysis. *Lancet.* 2011;378(9797):1139–65. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61337-8.
  8. MacCarthy S, Laher F, Nduna M, Farlane L, Kaida A. Responding to her question: a review of the influence of pregnancy on HIV disease progression in the context of expanded access to HAART in sub-Saharan Africa. *AIDS Behav.* 2009;13(S1):66–71. DOI: 10.1007/s10461-009-9541-2.
  9. Gounder CR, Wada NI, Kensler C, Violari A, McIntyre J, Chaisson RE et al. Active tuberculosis case-finding among pregnant women presenting to antenatal clinics in Soweto, South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57(4):77–84. DOI: 10.1097/QAI.0b013e31821ac9c1.
  10. Calvert C, Ronsmans C. The contribution of HIV to pregnancy-related mortality: a systematic review and meta-analysis. *AIDS.* 2013;27(10):1631–9. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32835fd940.
  11. Morelli S, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Res Rep Biol.* 2015;6:171–89. DOI: 10.2147/RRB.S80652.
  12. Heffron R, Donnell D, Kiarie J, Rees H, Ngure K, Mugo N et al. A prospective study of the effect of pregnancy on CD4 counts and plasma HIV-1 RNA concentrations of antiretroviral-naïve HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;65(2):231–6. DOI: 10.1097/QAI.000000000000013.
  13. Hoffmann C, Rockstroh JK. HIV 2009. Hamburg: Medizin Focus Verlag, 2009. 670 p.
  14. Беляков Н.А., Рахманова А.Г. (ред.). Вирус иммунодефицита человека – медицина: Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. 752 с.  
Belyakov NA, Rakhmanova AG (eds.). Virus immunodeficientia cheloveka – medicina: Rukovodstvo dlya vrachey. Saint Petersburg: Baltijskiy medicinskiy obrazovatel'nyy center, 2010. 752 p. (In Russ.).
  15. Mofenson LM, Laughon BE. Human immunodeficiency virus, mycobacterium tuberculosis, and pregnancy: a deadly combination. *Clin Infect Dis.* 2007;45(2):250–3. DOI: 10.1086/518975.
  16. Gupta A, Nayak U, Ram M, Bhosale R, Patil S, Basavraj A et al. Postpartum tuberculosis incidence and mortality among HIV-infected women and their infants in Pune, India, 2002–2005. *Clin Infect Dis.* 2007;45(2):241–9. DOI: 10.1086/518974.
  17. Eltom MA, Jemal A, Mbulaiteye SM, Devesa SS, Biggar RJ. Trends in Kaposi's Sarcoma and Non-Hodgkin's Lymphoma Incidence in the United States From 1973 Through 1998. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(16):1204–10. DOI: 10.1093/jnci/94.16.1204.
  18. Flore O. Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 2004; 364(9436):740–1. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16952-3.
  19. Morissens M, Viart P, Tecco L, Wauthy P, Michiels S, Dessy H et al. Does congenital heart disease severely jeopardise family life and pregnancies? Obstetrical history of women with congenital heart disease in a single tertiary centre. *Cardiol Young.* 2013;23(1):41–6. DOI: 10.1017/S1047951112000200.
  20. Chu L, Zhang J, Li YN, Meng X, Liu YY. Clinical treatment of infective endocarditis with vegetations in pregnant women and the outcomes of gestation. *Chin J Obstet Gynecol.* 2016;51(5):331–8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2016.05.003.
  21. Bartlett JG, Gallant JE, Pham PA. Medical Management of HIV Infection. Boston: Knowledge Source Solutions, 2009. 557 p.
  22. Пархоменко Ю.Г., Зайратьянц О.В., Макарова О.В. Сепсис. Инфекционный эндокардит. Этиология, патогенез. Руководство для врачей. Москва: Группа МДВ, 2013. 104 с.  
Parkhomenko YuG, Zairatyants OV, Makarova OV. Sepsis. Infektsionnyi endokardit. Etiologiya, patogenez. Rukovodstvo dlya vrachey. Moscow: MDV Group, 2013. 104 p. (In Russ.).
  23. Пономарева Е.Ю., Роцина А.А., Ребров А.П. Особенности течения инфекционного эндокардита на фоне ВИЧ/СПИДа у инъекционных наркоманов. Клиницист. 2011;5(3):19–23.  
Ponomareva EY, Roshchina AA, Rebrov AP. Distinguished characteristics of infective endocarditis in HIV/AIDS among intravenous drugs abused. *The Clinician.* 2011;5(3):19–23 (In Russ.).
  24. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
  25. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2095–128. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.

### Информация об авторах

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека; заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31.

Александр Георгиевич Конопляников – доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова; акушер-гинеколог ЦПСиР.

Янина Юрьевна Кудрявцева – врач-патологоанатом, ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН.

Юрий Георгиевич Пархоменко – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека; заведующий патологоанатомическим отделением ИКБ № 2.

Антон Сергеевич Оленев – кандидат медицинских наук, главный внештатный специалист по акушерству и гинекологии, заведующий Перинатальным центром ГКБ № 24, доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института РУДН.

Олег Александрович Тишкевич – врач-патологоанатом ИКБ № 2.

Наталия Александровна Грачева – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом ГКБ № 31.

Андрей Евгеньевич Бирюков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека; врач-патологоанатом ГКБ № 31.

Сергей Александрович Михалев – акушер-гинеколог, заведующий отделением платных медицинских услуг ЦПСИР.

Екатерина Николаевна Сонголова – кандидат медицинских наук, заведующая организационно-методическим отделом по акушерству и гинекологии НИИ ОЗММ.

### Author information

Lyudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology; Head of the Pathology Department, City Clinical Hospital No. 31.

<http://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Alexander G. Konoplyannikov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University; Obstetrician and Gynecologist, Family Planning and Reproduction Center.

<https://orcid.org/0000-0001-9923-8833>

Yanina Yu. Kudryavtseva – Pathologist, Assistant, Pathology Department, Peoples' Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-7218-0798>

Yury G. Parkhomenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology; Head of the Pathology Department, Infectious Clinical Hospital No. 2.

<https://orcid.org/0000-0001-9857-3402>

Anton S. Olenev – Cand. Sci. (Med.), Chief Specialist in Obstetrics and Gynecology; Head of the Perinatal Center of City Clinical Hospital No. 24; Associate Professor, Obstetrics and Gynecology Department, Peoples' Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0001-9632-6731>

Oleg A. Tishkevich – Pathologist, Infectious Clinical Hospital No. 2.

<https://orcid.org/0000-0002-0789-7709>

Nataliya A. Gracheva – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, City Clinical Hospital No. 31.

<https://orcid.org/0000-0001-7286-6629>

Andrey E. Biryukov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Research Institute of Human Morphology; Pathologist, City Clinical Hospital No. 31.

<https://orcid.org/0000-0001-9700-3352>

Sergey A. Mikhalev – Obstetrician-Gynecologist, Head of the Department of Commercial Medical Services, Family Planning and Reproduction Center.

<https://orcid.org/0000-0002-4822-0956>

Ekaterina N. Songolova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Organizational and Methodological Department for Obstetrics and Gynecology, Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management.

<https://orcid.org/0000-0003-4366-2306>

DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.43-49

## Setting of reliable immunohistochemical criteria for the recurrence of nodular basal cell carcinoma

*N. Yu. Orlinskaya, D. V. Davydenko, I. L. Shlivko, O. E. Garanina*

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of Russia, Nizhny Novgorod, Russia

**Introduction.** Basal cell carcinoma (BCC) is one of the most prevalent skin neoplasms with increasing incidence. The grade of BCC malignancy is highly variable and depends on the invasiveness and recurrence potential. The study was aimed at identification of immunohistochemical (IHC) determinants of BCC recurrence.

**Materials and methods.** The comparative study encompassed 10 cases of primary BCC and 10 cases of recurrent BCC. The panel of immunohistochemical targets included p53, CK8/18, Bcl-2, CK19, Collagen type IV, Desmin, CD8, Ki-67, Vimentin, VEGFR, EGFR and AR.

**Results.** Diffuse expression of vimentin (characteristic of both primary and recurrent BCCs and clearly indicating the border between the tumor stroma and the surrounding dermis) in the recurrent tumors was twice as strong as in the primary tumors. Immunohistochemistry for collagen type IV revealed different nature of the basement membrane alterations in the primary and recurrent tumors. A two-fold increase in the intensity of angiogenesis observed in the recurrent tumors was accompanied by a more than two-fold significant increase in the androgen receptor protein expression.

**Conclusion.** Increasing grade of BCC malignancy is associated with the immunohistochemically revealed reinforcement of the stromal and vascular components of the tumor, as well as progressive destruction of the basement membrane along with the increased expression of androgen receptor protein by tumor cells.

**Keywords:** basal cell carcinoma, recurrence, immunohistochemistry

**Corresponding author:** Natalia Yu. Orlinskaya. E-mail: orlinskaya@rambler.ru

**For citation:** Orlinskaya N. Yu., Davydenko D. V., Shlivko I. L., Garanina O. E. Setting of reliable immunohistochemical criteria for the recurrence of nodular basal cell carcinoma. Clin. exp. morphology. 2020;9(3):43–49. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.43-49.

**Funding.** The work was carried out within the framework of State Assignment to Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of Russia «Development of diagnostic methods and personalized methods for the treatment of malignant skin tumors based on the methods of fluorescence bioimaging and fluorescence imaging in the near and K-band» (No. AAAA-A18-118052190081-8).

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

Received 25.11.2019. Received in revised form 20.05.2020. Accepted 29.06.2020.

УДК 616-006.63

## Иммуногистохимические критерии рецидивирования базально-клеточной карциномы нодулярного строения

*Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко, И.Л. Шливко, О.Е. Гаранина*

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Базально-клеточная карцинома является одним из самых частых новообразований кожи и имеет тенденцию к повышению уровня заболеваемости. Среди критериев злокачественности этой группы новообразований нужно отметить ее инвазивный потенциал и способность к рецидивному росту. Цель исследования – определить иммуногистохимические особенности стромального компонента базально-клеточных карцином для прогноза рецидивирования.

**Материалы и методы.** В исследуемую группу вошли 10 случаев первичных и 10 случаев рецидивных базально-клеточных карцином. Для иммуногистохимического исследования использовали панель антител, включающую в себя следующие маркеры: p53, CK8/18, Bcl-2, CK19, Collagen IV, Desmin, CD 8, Ki-67, Vimentin, VEGFR, EGFR, Androgen receptor.

**Результаты.** По данным гистологического и иммуногистохимического исследования экспрессия виментина, носящая диффузный характер в первичных и рецидивных опухолях, не только позволила

четко определить границу опухолевой стромы и окружающей дермы, но и в 2 раза отличалась по количественным значениям. Экспрессия коллагена IV типа показала различный характер изменений базальной мембраны в первичных и рецидивных опухолях. В рецидивных опухолях было установлено усиление ангиогенеза в 2 раза. Экспрессия андрогенов также показала достоверную разницу более чем в 2 раза.

**Заключение.** По мере нарастания агрессивных свойств базально-клеточного рака кожи возрастает экспрессия антигенов основных волокнистых стромальных структур, увеличивается индекс пролиферативной активности, происходит усиление ангиогенеза.

**Ключевые слова:** базально-клеточная карцинома, рецидив, иммуногистохимия

**Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Орлинская. E-mail: orlinskaya@ Rambler.ru

**Для цитирования:** Орлинская Н.Ю., Давыденко Д.В., Шлишко И.Л., Гаранина О.Е. Иммуногистохимические критерии рецидивирования базально-клеточной карциномы нодулярного строения. Клин. эксп. морфология. 2020;9(3):43–49. DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.43-49

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Приволжского исследовательского медицинского университета Минздрава России «Разработка способов диагностики и персонализированных методов лечения злокачественных новообразований кожи на основании методов флуоресцентного биоимиджинга и флуоресцентной визуализации в ближнем и К-диапазоне» (№ АААА-А18-118052190081-8).

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

**Статья поступила** 10.12.2019. **Получена после рецензирования** 03.02.2020. **Принята в печать** 14.05.2020.

## Introduction

Basal cell carcinoma (BCC; synonyms: basalioma, basal cell epithelioma) is the most prevalent malignant tumor of the skin. According to the WHO Classification of Skin Tumors (2018), BCCs (which consist of basaloid cells) are classified as truly malignant as they show uncontrolled growth with infiltration and destruction of the underlying tissues, which also allows classifying them as tumors with locally destructive growth [1]. BCC can develop at any age, but is predominantly seen in patients over 50 [2, 3]. Despite the wide variety of clinical and morphological variants, the prevalent form of BCC (42.8%) is nodular [4]. The nodular variants constitute 60–80% of all basal cell skin cancers [1].

The recurrence of tumors of this subgroup varies from 2–7% to 13.6–21.6% and is practically independent of the method of treatment during the first year after the therapy. The tumor recurs in 40% of the patients within 10 years after the treatment, and the cases of long-term (measured in years) ineffective therapy for basalioma are common. The multiplicity of factors for basalioma recurrence have been described, including large tumor size and the infiltrative-ulcerative type of growth with deep invasion and perineural expansion. Localization of the tumor is considered no less significant, with skin of the nose, nasolabial triangle, or lower eyelid with the involvement of the intermarginal strip being most susceptible to basalioma recurrence. The recurrence rate also increases with the development of a malignant focus against the background of precancerous skin lesions. Certain functional correlates of BCC recurrence propensity have been described as well, e.g. the elevated expression of vascular endothelial growth factor and its cognate receptor (VEGF/VEGFR) by tumor cells accompanied by high proliferative activity (indicated by increased expression of and Ki-67) and altered

expression of major regulators of apoptosis (p53, bcl-2). Nevertheless, none of the suggested mechanisms provides unambiguous explanation for the emergence of a localized process of the persistently recurrent nature [5–10]. Such a gap in knowledge makes the diagnosis and treatment of BCC a high-priority interdisciplinary focus of clinical dermatology, oncology and pathomorphology.

In this comparative study, we aimed at identification of immunohistochemical (IHC) determinants of BCC recurrence.

## Materials and Methods

The study encompassed 10 cases of primary BCC and 10 cases of recurrent BCC in patients of the Center for Diagnostics and Treatment of Skin Tumors of the Privolzhsky Research Medical University. Surgical treatment with the excision of a primary or recurrent tumor was based on clinical indications. The total sample included 8 men and 12 women, aged 72.5±13.1 years on average. In the group of patients with primary tumors, no recurrence episodes were observed for 3 years after the surgery. In the group of patients with recurrent BCCs, the recurrence emerged within 1–2.5 years after the surgery.

The surgical specimens were fixed in 10% formalin. The resection was performed with mandatory inking of the margins to determine the presence or absence of invasive growth. Routine histological processing of the material was implemented with the use of Excelsior ES tissue processor (Thermo Scientific, USA). The dehydrated specimens were embedded in paraffin with the use of HistoStar embedding workstation (Thermo Scientific), sectioned with the use of HM 325 rotary microtome (Thermo Scientific) at a 4–6 µm thickness and stained with H&E with the use of Gemini AS automated slide stainer (Thermo Scientific).

The IHC staining was carried out in a BOND-MAX automated module (Leica Biosystems, Germany).

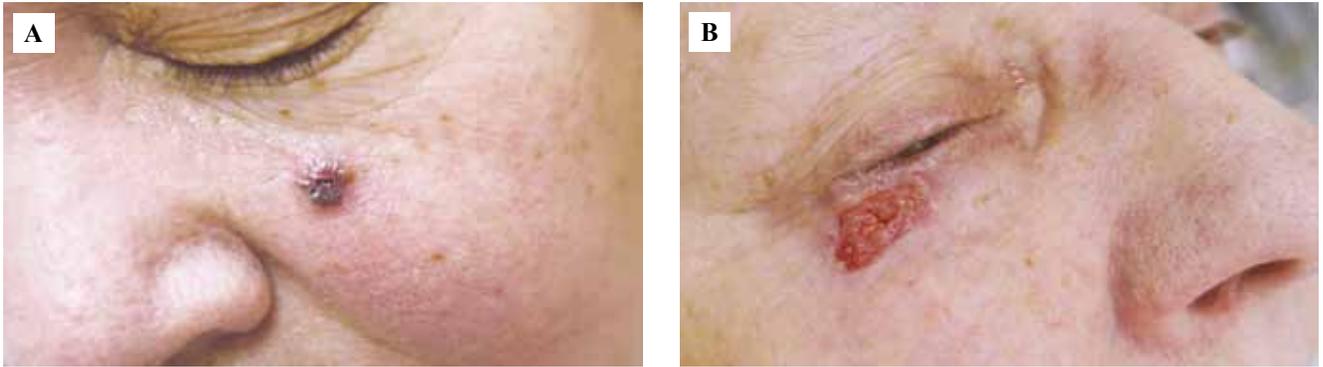


Figure 1. Clinical images of (A) – nodular basal cell carcinoma, (B) nodular basal cell carcinoma with ulcer rodens  
 Рис. 1. Клиническое изображение. А – узловая форма базально-клеточного рака, В – ulcer rodens при узловой форме базально-клеточного рака

The panel of antibodies used for IHC is given in Table 1.

The morphometry was carried out with the use of Leica DM2500 optical microscope (Leica, Germany).

The expression of antigens was evaluated by counting positively stained cells in 10 fields of view at a  $\times 400$  magnification. The expression indexes were calculated as the number of positive cells  $\times 100$ /total cell number.

The Mann-Whitney U-test was used to identify differences in the studied parameters between independent groups. The results are represented as median values (Me, Q50%) complemented with Q25% and Q75% values.

## Results and Discussion

In the studied cases, the nodular form of basal cell carcinoma was most frequently localized in the skin of the face and scalp, less often in the skin of the trunk, in 20% and 80% respectively. The tumor was more frequently represented by the single nodular pink or gray-pink formation of a hemispherical shape, the peripheral edge of which was surrounded by a ridge consisting of small “pearls” (Figure 1A) [11, 12]. Erosions or ulcers covered with a dark brown hemorrhagic crust were repeatedly found in the center of the tumor. In case of extensive ulceration

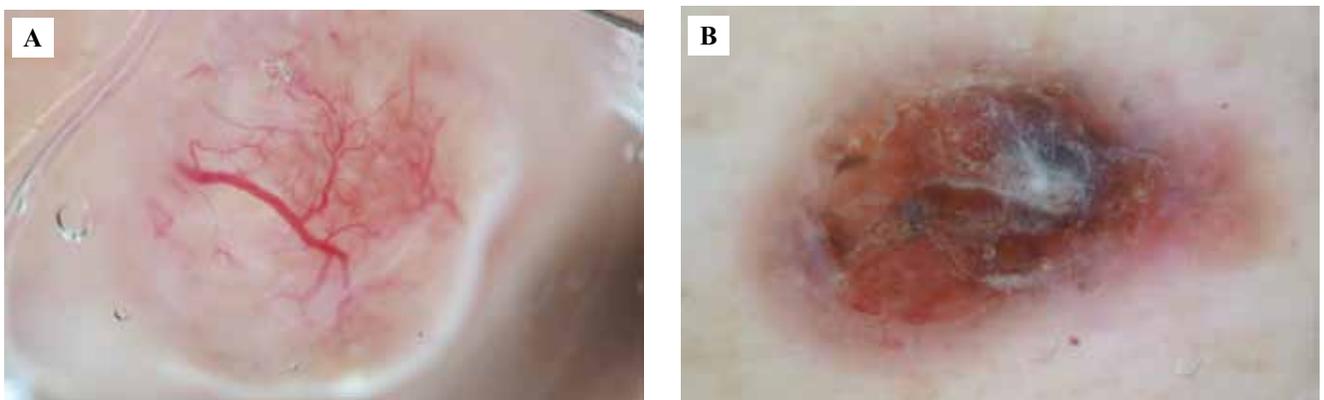


Figure 2. Dermatoscopy images of (A) – nodular basal cell carcinoma, (B) – pigmented nodular basal cell carcinoma  
 Рис. 2. Дерматоскопическое изображение. А – узловая форма базально-клеточного рака, В – пигментированная узловая форма базально-клеточного рака

Table 1 | Таблица 1

The panel of antibodies used in the study |  
 Панель антител, используемых в исследовании

	Title   Название	Clone   Клон	Manufacturer   Производитель
Mouse   Мышиные	p53	Do7	Novocastra, UK
	CK8/18	5D3	Novocastra, UK
	Bcl-2	124	Dako, Denmark
	CK19	Ks19.1	Lab Vision Corporation, USA
	Collagen IV	CIV22	USA
	Desmin	D33	Cell Marque, USA
	CD 8	4B11	Lab Vision Corporation, USA Novocastra, UK
Rabbit   Кроличьи	Ki-67	SP6	Diagnostic Biosystems, Netherlands
	Vimentin	SP20	Lab Vision Corporation, USA
	VEGFR	Poly	Lab Vision Corporation, USA
	EGFR	EP38Y	USA
	Androgen receptor	poly	Diagnostic Biosystems, Netherlands
			Lab Vision Corporation, USA Lab Vision Corporation, USA

with central necrosis, it was diagnosed as an ulcerative form or a corroding ulcer (*ulcus rodens*) (Figure 1B).

The dermatoscopy images of nodular BCCs in the studied cohort revealed the presence of large tree-like vessels of a bright-red color, the areas of erosion or ulceration covered with a dark-brown hemorrhagic scab, and bluish-gray ovoid structures and globules with pigmentation (Figure 2 A, B). Upon macroscopic examination of the surgical specimens, primary BCCs were distinguished by large size of nodular formations and smooth surface exhibiting telangiectasias. In primary BCCs, the entire tumor focus was represented by a solitary nodule with tuberous surface or an ulcerated core walled with a scalloped array of nodular elements (Figure 3).

Histological examination of the tumors revealed small basaloid cells – intensely stained, with compact rounded or oval nuclei. The H&E staining revealed neither specific structural features of the chromatin nor nucleoli; the cytoplasm, usually basophilic, was scarce. The periphery of the foci was occupied by zones of larger prismatic cells with oval, slightly elongated nuclei and characteristic palisade arrangement, regarded as a key histological determinant of BCC. The tumor cells showed no intercellular bridges but contained mitotic figures. The fibro-cellular connective tissue stroma of the tumor was organized in bundles which divided the cellular complexes into lobules separated from the metachromatic mucoid substance rich in glycosaminoglycans and comprising the infiltrates of lymphocytes, basophils and plasma cells. In slides, the epithelial tumor complexes were frequently separated from the stroma by characteristic clefts classified as retraction artifacts typical for BCC (Figure 4).

The overall dimensions of the neoplasms ranged from 0.5 to 2.5 cm. The invasion was confined to the dermis in all cases. The distance from the tumor to the closest resection margin ranged from 0.1 to 0.15 mm. The resection margins were tumor-negative in all cases, and no signs of perineural invasion were observed. The groups of primary and recurrent tumors were further compared by IHC criteria (Table 2).

Proliferative activity of primary and recurrent BCCs was characterized by uniform distribution of Ki-67-positive tumor cells which amounted to 26% in primary tumors and 46% in recurrent tumors ( $p = 0.0023$ , Figure 5). The vimentin expression was diffuse and provided a clear demarcation of the border between the tumor stroma and the surrounding dermis. The content of vimentin-positive cells in primary BCCs (20%) was lower than in recurrent BCCs (47%,  $p = 0.026$ , Figure 6). We do not as-

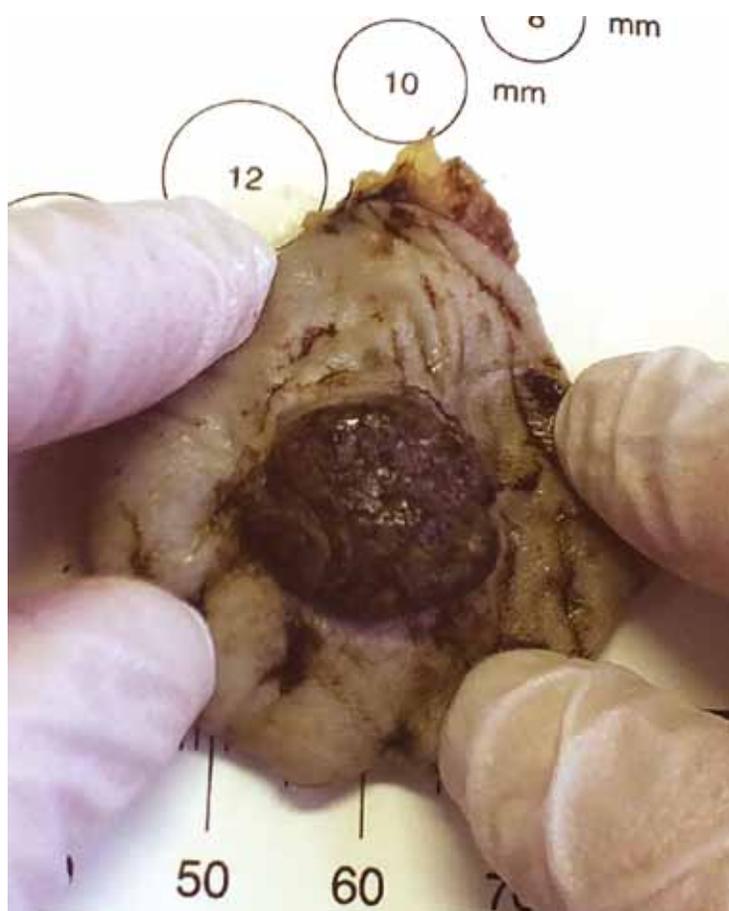


Figure 3. Gross appearance of nodular basal cell carcinoma  
Рис. 3. Макроскопическая картина базально-клеточной карциномы узлового строения

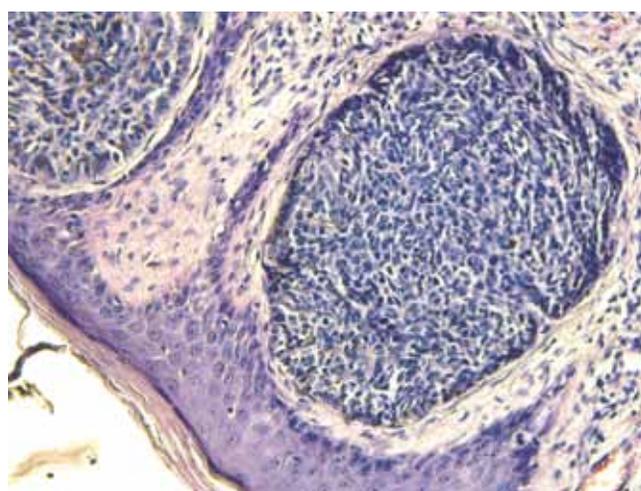


Figure 4. Routine histology of nodular basal cell carcinoma.  
H&E, magnification  $\times 200$   
Рис. 4. Гистологическая картина узловой формы базально-клеточной карциномы. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

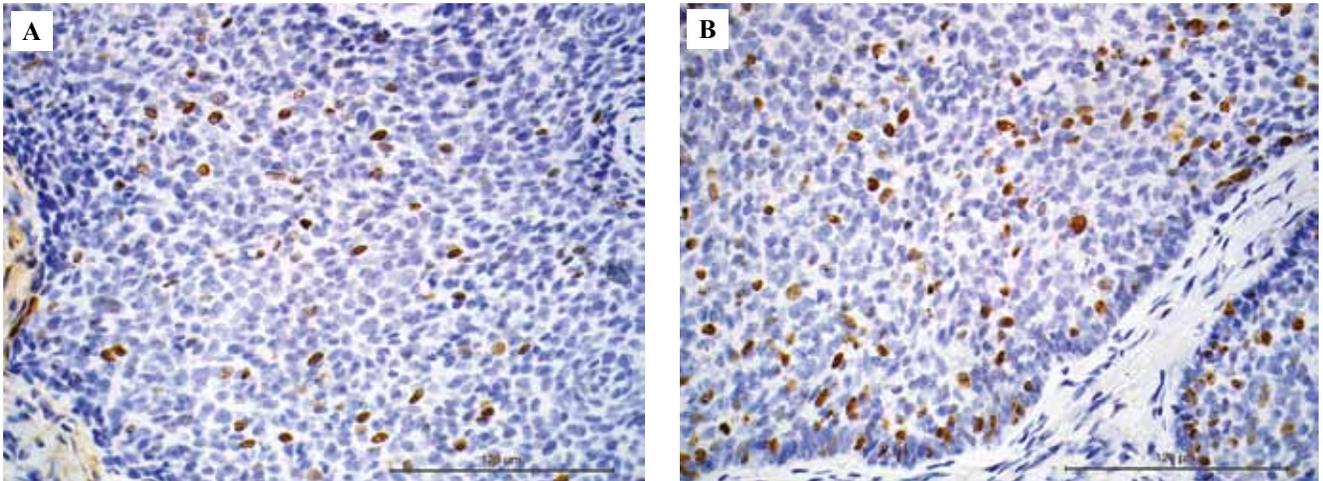


Figure 5. Ki-67 protein expression in (A) – primary BCCs, (B) – recurrent BCCs. Immunohistochemistry, magnification  $\times 400$   
 Рис. 5. Экспрессия Ki-67 в первичных (A) и рецидивных (B) опухолях. ИГХ окрашивание,  $\times 400$

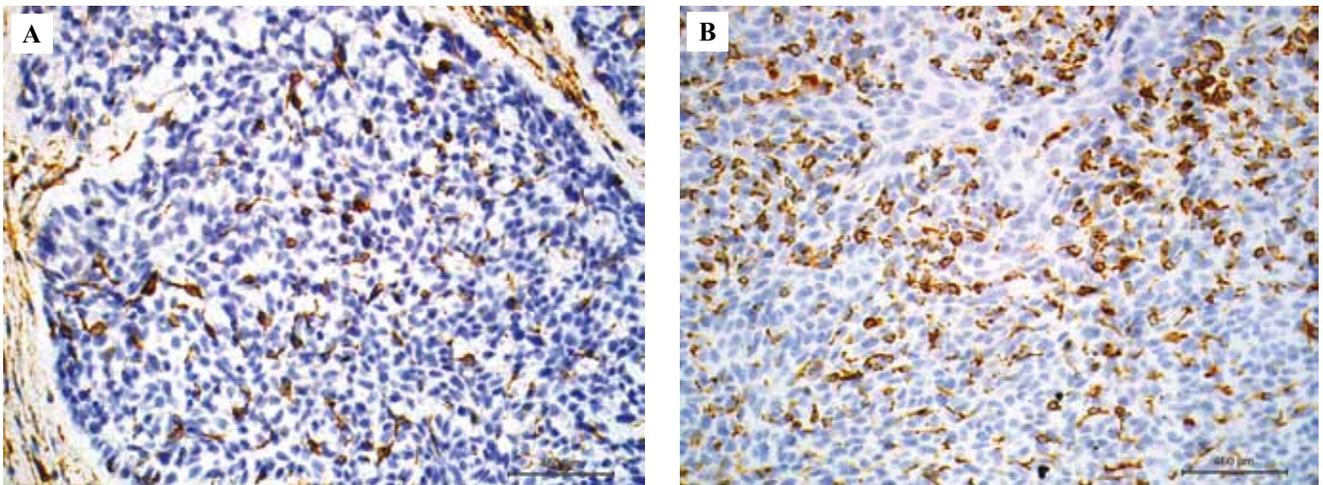


Figure 6. Vimentin protein expression in (A) – primary tumors, (B) – recurrent tumors. Immunohistochemistry, magnification  $\times 400$   
 Рис. 6. Экспрессия виментина в первичных опухолях (A) по сравнению с рецидивными опухолями (B). ИГХ окрашивание,  $\times 400$

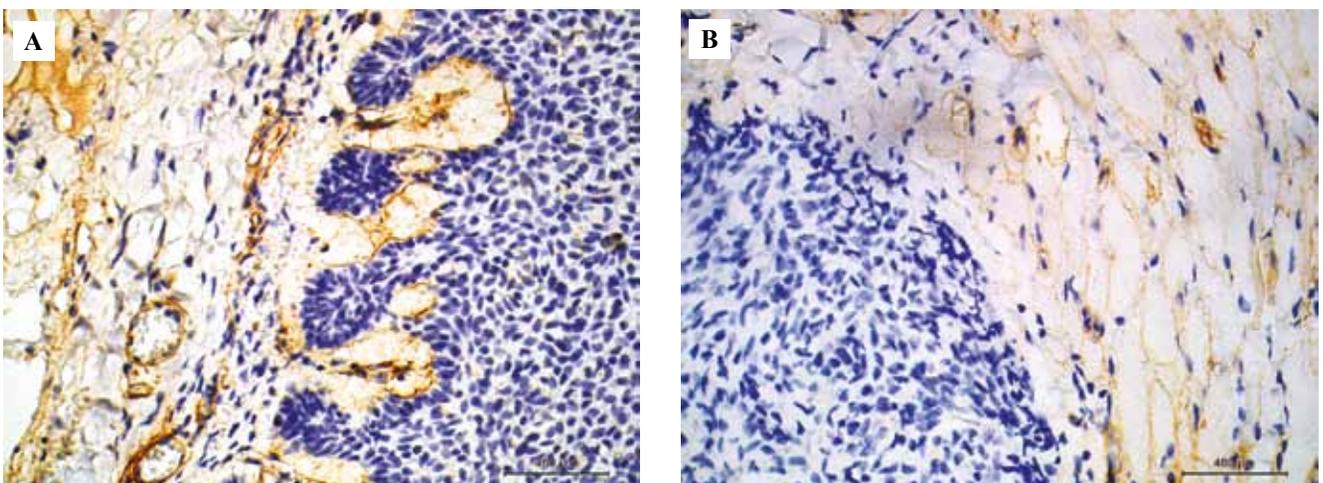


Figure 7. IHC image for collagen type IV revealing (A) – ruptures of the basement membrane in primary tumors, (B) – destruction of the basement membrane in recurrent tumors. Immunohistochemistry, magnification  $\times 400$   
 Рис. 7. Коллаген IV типа. Разрыв базальной мембраны в первичных опухолях (A), отсутствие базальной мембраны в рецидивных опухолях (B). ИГХ окрашивание,  $\times 400$

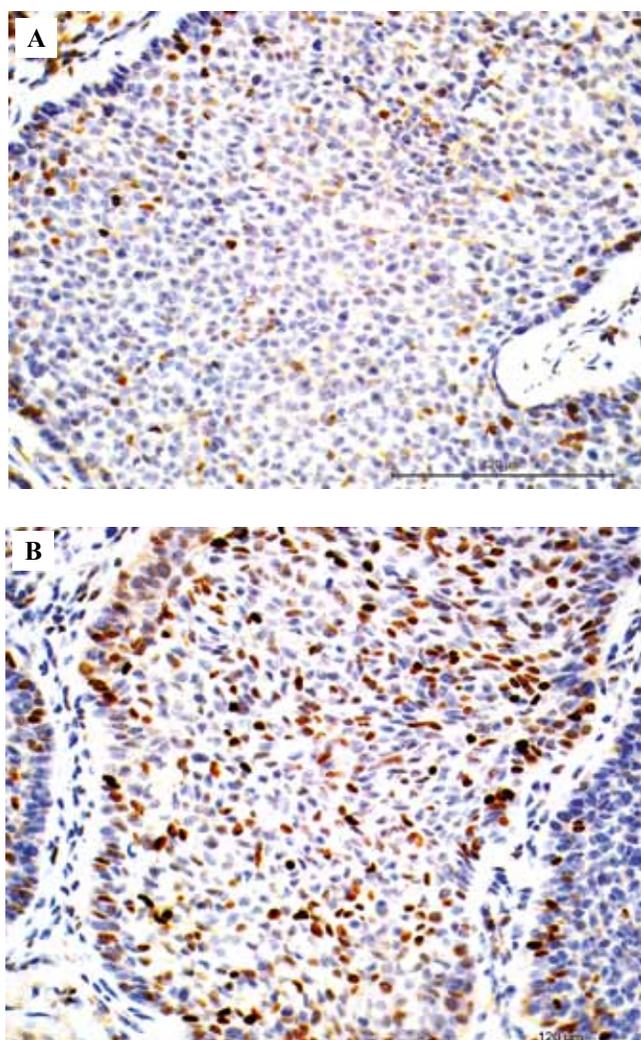


Figure 8. AR protein expression in the nuclei of tumor cells (A) – in primary tumors, (B) – in recurrent tumors. Immunohistochemistry, magnification  $\times 400$ .

Рис. 8. Экспрессия рецепторов андрогенов в ядрах опухолевых клеток. А – в первичных опухолях, В – в рецидивных опухолях. ИГХ окрашивание,  $\times 400$

sociate the expression of vimentin with the presence of melanocytes, as the study involved unpigmented forms of the tumor.

IHC with antibodies to collagen type IV revealed ruptures of the basement membrane in primary tumors and its complete absence in recurrent tumors (Figure 7).

The content of androgen receptor-positive cells in the nodules of primary BCCs (15%) was lower compared with recurrent BCCs (42%,  $p = 0.002$ , (Figure 8).

IHC for vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) revealed diffuse staining of clustered tumor cells in all cases; the increased content of positive cells in recurrent BCCs (32% compared to 12% in the primary tumors) indicates the elevated rates of angiogenesis in the recurrent neoplasms.

Table 2 | Таблица 2

Comparative immunohistochemical characteristic of primary and recurrent basal cell carcinomas (BCC) | Сравнительная иммуногистохимическая характеристика первичного и рецидивного базального-клеточного рака (БКР)

IHC marker   ИГХ маркер	Primary BCC (n=10)   Первичный БКР (n=10)	Recurrent BCC (n=10)   Рецидивный БКР (n=10)
p53	35 $\pm$ 4,2%	35 $\pm$ 3,4%
Ki-67	26 $\pm$ 2,9%	46 $\pm$ 3,7%
Bcl-2	+	+
CK8/18	+++	+++
CK19	–	–
Collagen type IV   Коллаген IV типа	+ (basal membrane with ruptures)   (базальная мембрана с разрывами)	++ (there is no basal membrane)   (базальная мембрана отсутствует)
Vimentin	20 $\pm$ 6,1%	47 $\pm$ 5,3%
Desmin	–	–
EGFR	26 $\pm$ 1,9%	46 $\pm$ 2,4%
CD 8	–	–
Androgen receptor   Рецепторы андрогенов	15 $\pm$ 3,9%	42 $\pm$ 4,2%
VEGF	12 $\pm$ 4,8%	32 $\pm$ 4,2%

## Conclusion

The study identified significant IHC determinants of BCC recurrence, including the increased Ki-67 index, progressive destruction of the basement membrane, and the increased expression of vimentin, EGFR, VEGFR and notably the androgen receptor (AR).

No differences in the expression of apoptosis-related regulatory proteins (p53, bcl-2) were observed between the groups. The expression of CK8/18 was ubiquitous; the staining for CK19, Desmin and CD8 was weak and showed no difference between the groups. The study revealed no clear correlation between the size of BCC and its aggressive properties. The possibility of using AR as a diagnostic marker or therapeutic target in BCCs requires further investigation.

**Author contributions**

N.Yu.O., I.L.S. and O.E.G. conceived the study and designed the experiments;  
O.E.G., N.Yu.O. and D.V.D. collected the data and performed the analysis;  
N.Yu.O., D.V.D., I.L.S. and O.E.G. wrote the manuscript;  
D.V.D. edited the manuscript.

**References**

1. WHO classification of skin tumors. International Agency for Research on Cancer, 2018.
2. *Patterson JW*. Weedon's skin pathology. 4th ed. London: Churchill-Livingstone, 2016. P. 806–11.
3. *Cernea CR, Ferraz AR, de Castro IV, Sotto MN, Logullo AF, Bacchi CE et al*. p53 and skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(3):471–5. DOI: 10.1016/j.otohns.2005.10.030.
4. *Collins SA*. Clinical presentation. In: Miller SJ, Maloney ME (eds.). *Cutaneous oncology*. Blackwell Science: Malden, MA, 1998. P. 625–32.
5. *Kaur P, Mulvaney M, Carlson JA*. Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(4):293–307. DOI: 10.1097/0000372-200608000-00002.
6. *Panuncio A, Vignale R, Lopez G*. Immunohistochemical study of nerve fibres in basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2003;13(3):250–3.
7. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A (eds.). *Pathology and genetics of skin tumors. WHO classification of tumors*. Lyon: IARC Press, 2006. 357 p.
8. *Quatresooz P, Martalo O, Piérard GE*. Differential expression of alpha1 (IV) and alpha5 (IV) collagen chains in basal-cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2003;30(9):548–52. DOI: 10.1034/j.1600-0560.2003.00118.x.
9. *Bertheim U, Hofer PA, Engström-Laurent A, Hellström S*. The stromal reaction in basal cell carcinomas. A prerequisite for tumour progression and treatment strategy. *Br J Plast Surg*. 2004;57(5):429–39. DOI: 10.1016/j.bjps.2003.12.024.
10. *Habet JM*. Cellular immunopathology. In: Miller SJ, Maloney ME (eds.). *Cutaneous oncology*. Blackwell Science: Malden, MA, 1998. P. 599–601.
11. *Dourmishev LA, Rusinova D, Botev I*. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian Dermatol Online J*. 2013;4(1):12–7. DOI: 10.4103/2229-5178.105456.
12. *Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B*. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol*. 2002;147(1):41–7. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2002.04804.x.

**Author information**

Natalia Yu. Orlinskaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0003-2896-2968>

Dina V. Davydenko – Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Department of Pathological Anatomy, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0002-8339-1291>

Irena L. Shlivko – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Skin and Sexually Transmitted Diseases, Privolzhsky Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7253-7091>

Oksana E. Garanina – Cand. Sci. (Med.), Oncologist, Dermatovenerologist, Research Assistant of the Department of Skin and Sexually Transmitted Diseases, Privolzhsky Research Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0002-7326-7553>

## Особенности морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона мыши на ранних сроках экспериментального невынашивания беременности

К.А. Артемьева<sup>1</sup>, И.М. Богданова<sup>1</sup>, И.И. Степанова<sup>1</sup>, М.Н. Болтовская<sup>1</sup>, А.А. Степанов<sup>1</sup>,  
Е.А. Пономаренко<sup>1</sup>, О.В. Калюжин<sup>2</sup>, А.Е. Земляков<sup>3</sup>, С.В. Дамбаева<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

<sup>4</sup> Университет медицины и науки имени Розалинд Франклин, Северный Чикаго, США

**Введение.** Основная доля случаев привычного невынашивания беременности тесно связана с нарушениями материнской иммунной толерантности. Для изучения патогенеза ранних репродуктивных потерь широко используются экспериментальные модели аборт у мышей, на которых установлены критические сроки, определяющие прогрессирование беременности. Однако взаимосвязь развития эмбриона и экстраэмбриональных структур с иммунным микроокружением изучена недостаточно. Цель исследования – сравнительная оценка морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона в ранние сроки беременности при экспериментальных спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах.

**Материалы и методы.** Для воспроизведения аллогенной физиологической беременности использовали комбинацию мышей ♀СВА×♂BALB/c, спонтанные аборты воспроизводили при скрещивании ♀СВА×♂DBA/2. Иммунозависимые индуцированные или потенцированные аборты моделировали, соответственно, в комбинациях ♀СВА×♂BALB/c или ♀СВА×♂DBA/2 внутрибрюшинным введением иммуномодулятора β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на 5-й и 7-й день гестации. Мышей выводили из эксперимента на 8-й день беременности, выделяли рога матки и маточно-плацентарные единицы. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и проводили стандартную обработку для гистологического исследования. На препаратах экваториальных срезов измеряли площадь сечения маточно-плацентарных единиц, анализировали материнские, зародышевые и внезародышевые структуры. Для выявления макрофагов проводили иммуногистохимическую реакцию с кроличьими поликлональными анти-CD68 антителами, определяли плотность CD68<sup>+</sup> клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади децидуальной оболочки.

**Результаты.** На 8-й день беременности отмечали уменьшение площади поперечного сечения маточно-плацентарных единиц в группах индуцированных и потенцированных аборт по сравнению с физиологической беременностью и спонтанными абортами. При спонтанных абортах наблюдали окклюзированные материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта, при индуцированных и потенцированных абортах – расширение сосудов в зоне мезометриальной decidua и застой крови в них, уплотнение трофобласта и кровоизлияния в decidua basalis. На раннем сроке моделирования спонтанных и иммунозависимых аборт выявляли нарушения в развитии эмбриона и экстраэмбриональных структур от начальных признаков резорбции до полного разрушения зародыша и мембран.

Показатели плотности CD68<sup>+</sup> макрофагов в децидуальной оболочке маточно-плацентарных единиц жизнеспособных эмбрионов при всех вариантах невынашивания беременности статистически значимо не различались, при резорбции эмбрионов CD68<sup>+</sup> клетки не выявлялись.

**Заключение.** Воздействие иммуномодулятора С7МДП в гестационных сроках 5 и 7 суток (после завершения имплантации и до формирования зрелой плаценты), индуцирующее и потенцирующее аборты у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2, соответственно, приводит к уменьшению площади маточно-плацентарных единиц, гемоциркуляторным расстройствам в децидуальной оболочке, нарушениям морфогенеза хориона и развития эмбриона вплоть до его полной резорбции, отсутствию CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении резорбированных эмбрионов на 8-й день беременности.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, модели, β-гептилгликозид мурамилдипептида, маточно-плацентарная единица, макрофаги, иммунотолерантность

**Для корреспонденции:** Ксения Александровна Артемьева. E-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru

**Для цитирования:** Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Степанов А.А., Пономаренко Е.А., Калюжин О.В., Земляков А.Е., Дамбаева С.В. Особенности морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона мыши на ранних сроках экспериментального невынашивания беременности. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):50–60. DOI:10.31088/SEM2020.9.3.50-60

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050049-3).

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

Статья поступила 18.05.2020. Получена после рецензирования 03.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Morphofunctional features of the uteroplacental unit and mouse embryo in the early stages of experimental miscarriage

K.A. Artemyeva<sup>1</sup>, I.M. Bogdanova<sup>1</sup>, I.I. Stepanova<sup>1</sup>, M.N. Boltovskaya<sup>1</sup>, A.A. Stepanov<sup>1</sup>, E.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, O.V. Kalyuzhin<sup>2</sup>, A.E. Zemlyakov<sup>3</sup>, S.V. Dambaeva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>3</sup>V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

<sup>4</sup>Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, USA

**Introduction.** The majority of cases of habitual miscarriage are closely related to impaired maternal immune tolerance. Experimental mice models of abortion, where the critical time points are established to monitor pregnancy progression, are widely used to study the pathogenesis of early reproductive loss. However, the relationship between the embryonic development and extraembryonic structures with the immune microenvironment is not well understood. The aim of the study is to compare the morphofunctional characteristics of the uteroplacental unit and embryo in early pregnancy in mice with experimental spontaneous, induced, and potentiated abortions.

**Materials and methods.** Allogeneic physiological pregnancy was modeled using ♀CBA × ♂BALB/c mice mating. Spontaneous abortions were reproduced by mating ♀CBA × ♂DBA/2 mice. Induced abortions and potentiated abortions were triggered by intraperitoneal administration of the immunomodulator β-heptylglycoside muramyl dipeptide (MDP) to pregnant females on gestation day (gd) 5 and gd 7 mated in following combinations ♀CBA × ♂BALB/c and ♀CBA × ♂DBA/2, respectively. Mice were withdrawn from the experiment on gd 8, then uterine horns and uteroplacental units were isolated. The material was fixed in 10% neutral formalin, and standard processing was performed for histological examination. In equatorial sections, the cross-sectional area of uteroplacental unit was measured, and maternal, embryonic, as well as extraembryonic structures were analyzed. An immunohistochemical assay with rabbit polyclonal anti-CD68 antibodies was conducted to detect macrophages, then the density of CD68<sup>+</sup> cells per 1 mm<sup>2</sup> of the decidual area was determined.

**Results.** On day 8 of pregnancy, in the groups of induced and potentiated abortions cross-sectional area of the uteroplacental units was decreased compared with the groups of physiological pregnancy and spontaneous abortions. Induced and potentiated abortions demonstrated vasodilation in the mesometric decidua zone and stagnation of blood in the blood vessels, compaction of trophoblast, and hemorrhage in decidua basalis whether spontaneous abortions showed occluded maternal vessels surrounded by edematous and vacuolated trophoblast cells.

At the early stages of modeling of spontaneous and immuno-dependent abortions, disturbances in the development of the embryo and extraembryonic structures were revealed, ranging from initial signs of resorption to the destruction of the embryo and membranes.

In viable embryos, density indices of CD68<sup>+</sup> macrophages in the decidual membrane of the uteroplacental units did not differ significantly in all miscarriage cases, CD68<sup>+</sup> cells were not detected in cases of embryonal resorption.

**Conclusions.** The MDP treatment in a period after completion of implantation and before forming a mature placenta (gd 5–7) results in the inducing or the potentiating abortions in CBA females mated with by Balb/c or DBA/2 males, respectively. In both cases, we revealed disturbed chorion morphogenesis and embryonic development to the extent of its complete resorption and the absence of CD68<sup>+</sup> macrophages in resorbed embryos' microenvironment on day 8 of pregnancy.

**Keywords:** miscarriage, models, muramyl dipeptide β-heptylglycoside, uteroplacental unit, macrophages, immunotolerance

**For citation:** Artemyeva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N., Stepanov A.A., Ponomarenko E.A., Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Dambaeva S.V. Morpho functional features of the uteroplacental unit and mouse embryo in the early stages of experimental miscarriage. Clin. exp. morphol. 2020;9(3):50–60 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.50-60

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A17-117013050049-3).

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

**Received** 18.05.2020. **Received in revised form** 03.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

Самопроизвольный аборт является наиболее частой патологией беременности у человека. Около 10–15% беременностей заканчивается выкидышами в течение первого триместра, 1–5% ранних репродуктивных потерь составляют привычные самопроизвольные аборты (как минимум три последовательных выкидыша до 20 недель беременности) [1]. Основная доля случаев привычного невынашивания связана с нарушениями материнской иммунной толерантности, особенно с местными иммунными реакциями в маточно-плацентарной области [2–5]. Макрофаги (МФ) представляют вторую по численности (20–30%) после естественных киллерных клеток (70% в ранние сроки беременности) популяцию децидуальных лейкоцитов, число которых остается относительно постоянным в течение всего срока гестации. Децидуальные МФ локализованы в тесной ассоциации с инвазирующим трофобластом, взаимодействие с которым осуществляется через связывание лигандов, представленных на клетках трофобласта с соответствующими рецепторами, экспрессируемыми на МФ. Макрофаги материнского и фетального происхождения играют важную роль на всех стадиях гестационного процесса, включая децидуализацию стромы эндометрия, имплантацию эмбриона, формирование плаценты, роды и последующую инволюцию матки. Состояние активации и функции МФ в маточно-плацентарной зоне зависит от локального тканевого микроокружения. Нарушения в маточном микроокружении, особенно на ранних сроках беременности, могут влиять на активность МФ и приводить к осложнениям и неблагоприятному исходу беременности [6]. Важными характеристиками МФ являются их функциональная гетерогенность, то есть способность опосредовать воспалительную и противовоспалительную функции, и высокая степень пластичности, о чем свидетельствует способность МФ изменять фенотип и статус активации для поддержания специфической функциональной программы под действием сигналов микроокружения. При взаимодействии с локальным микроокружением некоммутированные МФ моноцитарного происхождения могут быть примированы соответствующими цитокинами и поляризованы в две основные популяции с разными фенотипическими и функциональными характеристиками – классически активированные М1 МФ и альтернативно активированные М2 МФ. Индукторами М1 МФ являются цитокины Т-клеток хелперов (ТХ)-1, таких как интерферон- $\gamma$  и бактериальный липополисахарид. М1 МФ вырабатывают и секретируют

высокий уровень провоспалительных цитокинов, в том числе фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкины ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-23 и экспрессируют хемокиновые рецепторы CCR1 и CCR5 [7]. Альтернативную активацию МФ индуцируют цитокины ТХ-2, главным образом ИЛ-4 и ИЛ-13. Цитокины, ростовые факторы и протеазы, секретируемые М2 МФ, участвуют в тканевом ремоделировании и создании материнской толерантности к антигенам трофобласта, а также в его дифференцировке. Клетки трофобласта секретируют различные хемокины, которые способны специфически привлекать МФ [8]. *In vivo* МФ, локализованные в decidua basalis в тесной близости с трофобластом, имеют характерные признаки, ассоциированные с альтернативной М2 активацией, включая экспрессию таких маркеров, как Stabilin-1, FХIIIa, VEGF и IL-10 [9]. Способность децидуальных МФ ремоделировать ткани и секретировать более 100 ростовых факторов и цитокинов дает основания предполагать их участие в таких процессах, как регуляция активности клеток иммунной системы, инвазия цитотрофобласта, ангиогенез и тканевое ремоделирование. Альтернативно активированный статус децидуальных МФ свидетельствует об их важной роли в регуляции воспалительного ответа, супрессии материнского иммунного ответа на фетальные антигены и индукции толерантности. Нарушение процессов дифференцировки, поляризации и активации маточных МФ в локальном микроокружении тесно связано с патофизиологией беременности [10].

Даже в случаях сохранения плода ранние гестационные экзо- и эндогенные нарушения в материнском организме, в том числе иммунные, могут негативно влиять на формирование плаценты и впоследствии приводить к плацентарной недостаточности [11]. Некоторые исследования показали, что малая площадь поверхности плаценты и ее низкая масса связаны с задержкой развития плода, перинатальной заболеваемостью и смертностью. Определение при ультразвуковом исследовании таких параметров, как площадь поверхности, объем и масса плаценты по отношению к массе тела плода, могут помочь в скрининговой диагностике задержки его роста и развития [12–14].

Для изучения механизмов невынашивания беременности широко используются модели на мышах, обладающих сходными с человеком гемохориальным типом плаценты, характером материнского и плодного кровообращения, структурой маточно-плацентарной области [15, 16]. На моделях установлен критический

период (E8.5–E9.5), определяющий прогрессирование беременности – от формирования хориоаллантоисной плаценты до начала фетального кровообращения. Нарушение координации между темпами развития эмбриона и экстраэмбриональных структур (трофоблеста и производных мезодермы) может стать причиной гибели зародыша, хотя внеэмбриональные структуры могут сохраняться в течение некоторого времени [17]. С целью разработки и оценки эффективности методов коррекции иммунозависимого невынашивания нами были созданы модели индуцированных и потенцированных абортотворных с высокой частотой эмбриональных потерь, вызванных введением самкам мышьяк β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) – вещества с четко определенным механизмом иммуномодулирующего действия [18]. Однако структура маточно-плацентарных единиц, развитие эмбрионов, формирование плаценты на ранних сроках после иммуномодулирующего воздействия не исследованы. Цель работы – сравнительная оценка морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона в ранние сроки беременности при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотворных.

## Материалы и методы исследования

### *Моделирование физиологической беременности, спонтанных и мурамилдипептид-зависимых абортотворных*

В исследовании использовали самок линий СВА (Н-2к) и самцов линий DBA/2 (Н-2d), Balb/c (Н-2d) с массой тела 20–25 граммов, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к лабораторному корму и воде. Эксперименты осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года, и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), а также правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267). На проведение исследования было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 6 А от 19 октября 2009 года).

Моделирование прогрессирующей аллогенной беременности и вариантов ее невынашивания проводили, как описано ранее [18]. Коротко, для получения дагированной беременности самок в стадии проэструс–эструс подсаживали на ночь к самцам в соотношении 3:1. День появления копулятивной пробки обозначали как 1-й день гестации (ДГ). Физиологическую беременность получали комбинацией ♀СВА×♂Balb/c, спонтанные абортотворные – скрещиванием ♀СВА×♂DBA/2, индуцированные абортотворные – внутрибрюшинным введением С7МДП самкам СВА, оплодотворенным самцами Balb/c, на 5-й

ДГ (завершение имплантации) и 7-й ДГ (до образования хориоаллантоисной плаценты) в дозе 20 мкг в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl на одно животное (≈1 мг/кг), потенцированные абортотворные – введением С7МДП по той же схеме самкам СВА, оплодотворенным самцами DBA/2.

Выведение мышей из эксперимента проводили на 8-й ДГ (начало формирования лабиринта плаценты) путем цервикальной дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом.

### *Гистологические и иммуногистохимические методы*

После выведения животных из эксперимента выделяли рога матки, маточно-плацентарные единицы (МПЕ). Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, после стандартной гистологической проводки в гистопроцессоре Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США), заливали в парафин на приборе Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) после депарафинирования окрашивали их гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия).

Общую популяцию макрофагов выявляли методом иммуногистохимического окрашивания с использованием кроличьих поликлональных анти-CD68 антител (1:100, ab 125212, Abcam, Великобритания) и системы детекции Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen (TL-015-HD, Thermo Scientific, Великобритания). По окончании инкубации с антителами срезы докрасивали гематоксилином Майера.

### *Морфометрические методы*

Морфометрическое исследование выполняли на микроскопе Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой с использованием программы ImageScopeM (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Площадь экваториального поперечного сечения МПЕ измеряли при помощи графического планшета. В маточно-плацентарных единицах анализировали стенку матки, децидуальную оболочку, зародышевые и внезародышевые структуры. Подсчитывали плотность CD68<sup>+</sup> клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади децидуальной оболочки при ×200.

### *Статистическая обработка результатов*

Данные анализировали в программе Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Использовали метод парных сравнений. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Анализ распределения площади экваториальных срезов МПЕ (табл. 1) позволил выявить исходно высокий

Площадь среза маточно-плацентарных единиц, мм<sup>2</sup>, Me (Q1;Q3) |  
 Uteroplacental units section area, mm<sup>2</sup>, Me (Q1; Q3)

Физиологическая беременность   Physiological pregnancy (n=30)	Спонтанные аборт   Spontaneous abortion (n=24)	Индукцированные аборт   Induced abortion (n=24)	Потенцированные аборт   Potentiated abortion (n=23)
3,52 (3,3; 3,6)	7,82 (5,03; 8,93)	2,65 (1,42; 3,96)	3,9 (3,44; 4,48)
Статистическая значимость   Statistical significance p1-2<0,001 p1-3=0,03 p2-4=0,002 p3-4=0,027			

показатель в группе спонтанных абортов в сравнении с группой физиологической беременности. Очевидно, это объясняется индивидуально-линейными различиями самцов в комбинациях DBA/2 и Balb/c, соответственно. Иммуномодулирующее воздействие приводило к значимому уменьшению площади среза МПЕ как в группе индуцированных абортов по сравнению с физиологической беременностью, так и в группе потенцированных абортов по сравнению со спонтанными. Возможно, это отражает нарушения плацентации и развития эмбриона.

Низкая площадь поверхности плаценты является одним из морфометрических параметров, достоверно связанным с гипоксемией, гипогликемией и задержкой внутриутробного развития и роста плода [19, 20]. Вероятно, выраженное уменьшение площади плаценты на ранних сроках может привести не только к замедлению роста, но и к гибели эмбриона вследствие нарушения функций, выполняемых этим органом.

Структура МПЕ при физиологической беременности представлена слоем миометрия, мезометриальной и антимезометриальной decidua (рис. 1 А), трофобластом и первичными гигантскими клетками трофобласта. В маточно-плацентарных единицах самок со спонтанными абортами наблюдали отключившиеся материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта (рис. 1 В). При индуцированных и потенцированных абортах отмечены расширение сосудов в зоне мезометриальной decidua (вплоть до формирования гигантских полостей) и застой крови в них, а также конденсация трофобласта и геморрагии в decidua basalis (рис. 1 С, D, E). В просвете маточной крипты в некоторых случаях наблюдали значительное скопление лимфоцитов (рис. 1 F).

Для развивающейся беременности характерны наличие полноценного эмбриона и сохранность зародышевых листков. На сроке 8 ДГ хорошо различается мембрана Рейхерта, эктоплацентарный конус имеет характерную заостренную форму. Четко визуализированы гигантские клетки трофобласта, расположенные по периметру эмбриональной полости на границе с decidua basalis (рис. 2 А).

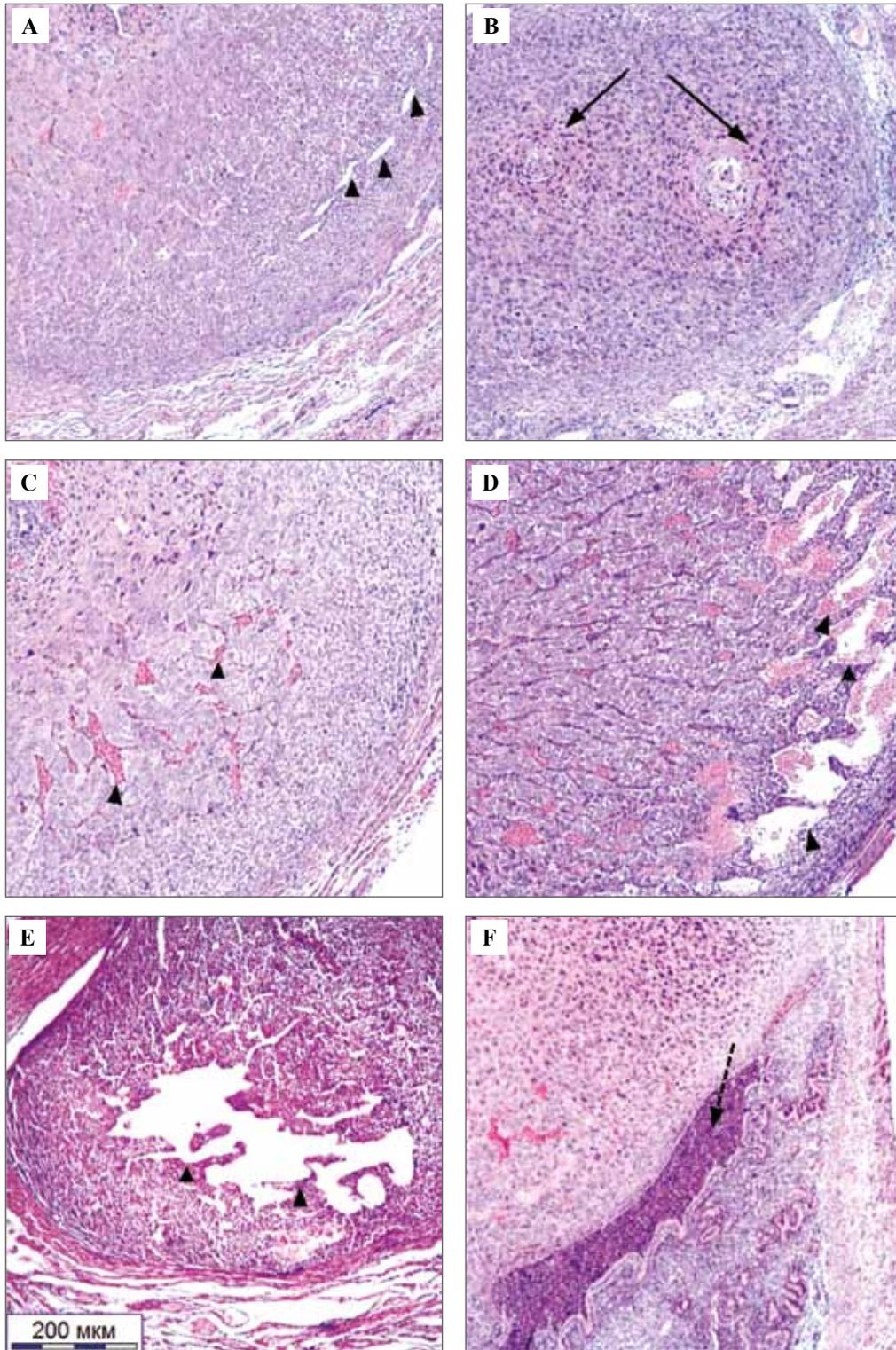
У самок с самопроизвольным, индуцированным и потенцированным невынашиванием беременности

наблюдали начальные признаки резорбции эмбриона [21], такие как задержка роста с небольшой зародышевой полостью (рис. 2 В), выраженные нарушения строения эктоплацентарного конуса – уплощение (рис. 2 В, С) или исчезновение (рис. 2 D). В ряде случаев отмечали отсутствие структур эмбриона, за исключением мембраны Рейхерта (рис. 2 E), полное разрушение зародыша, заполнение эмбриональной полости аморфным клеточным материалом и единичными гигантскими клетками трофобласта с вакуолизированной цитоплазмой (рис. 2 F), исчезновение эмбриональных полостей. D.A. Clark et al. также отмечали начало резорбции эмбриона на модели спонтанных абортов в сроке E 8.5 [22].

Выявленные на моделях спонтанных и иммунозависимых абортов нарушения эмбриогенеза и формирования экстраэмбриональных структур можно рассматривать как эмбриохориальную недостаточность – сочетанную патологическую реакцию эмбриона и экстраэмбриональных структур на различные экзо- и эндогенные нарушения материнского организма. У женщин нарушения эмбриогенеза и морфогенеза хориона в сроках до 9 недель гестации являются причиной потери беременности или ее осложнений, перинатальной заболеваемости и летальности [11].

Механизмы гибели плода до конца не выяснены. На модели спонтанных абортов показано, что усиление продукции провоспалительных цитокинов приводит к активации протромбиназы fgl2, вызывающей нарушения гемодинамики в материнских сосудах и ишемию плаценты [22, 23]. Высокий уровень резорбции эмбрионов при индуцированном и потенцированном невынашивании беременности (46,7 и 50,0%, соответственно) уже через 72 часа после начала воздействия иммуномодулятора, очевидно, обусловлен способностью С7МДП стимулировать клеточный иммунный ответ и дифференцировку ТХ в направлении ТХ1 [24]. Показатели частоты резорбции на 8-й ДГ практически совпадали с нашими результатами определения уровня эмбриональных потерь при индуцированных и потенцированных абортах на 14-й ДГ [18, 24].

В случаях сохранения эмбриона наблюдаемые на ранних сроках беременности нарушения строения или отсутствие эктоплацентарного конуса, клетки которого



*Рис. 1.* Строение маточно-плацентарной единицы самок мышей СВА на 8-й день гестации.

А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборт, С, Е – индуцированные аборт, D, F – потенцированные аборт. Сплошные стрелки – окклюзированные материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта, пунктирная стрелка – скопление лимфоцитов в просвете маточной крипты, наконечники стрелок – материнские лакуны. Окрасивание гематоксилином и эозином,  $\times 50$

*Fig. 1.* The uteroplacental units structure in CBA mice on the gestation day 8.

A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C, E – induced abortion, D, F – potentiated abortion. The solid arrows indicate the occluded maternal vessels surrounded by edematous and vacuolated cells, the dotted arrow indicates is the accumulation of lymphocytes in the lumen of the uterine crypt, and the arrowheads demonstrate the mother's lacunae. H&E stain,  $\times 50$

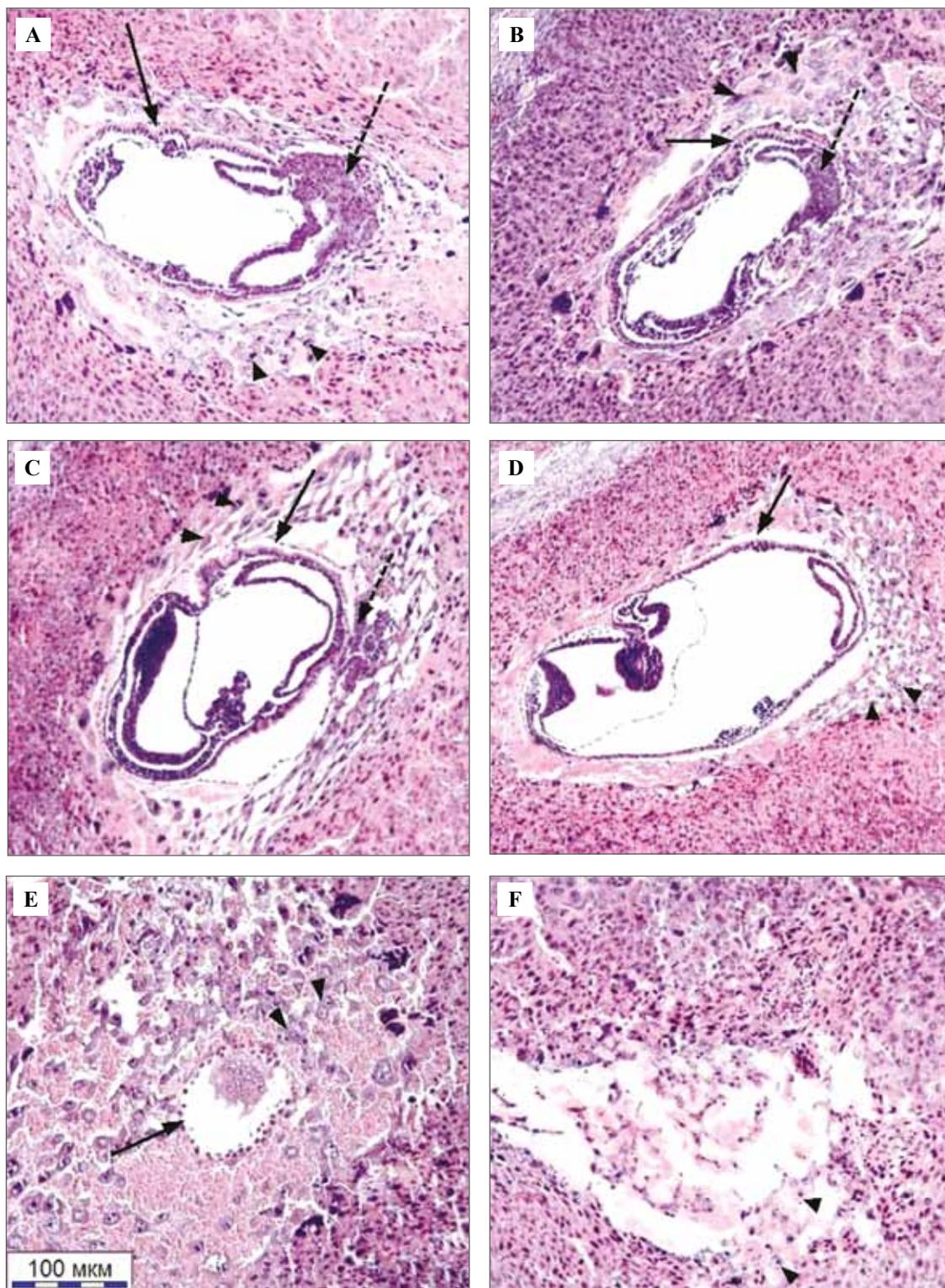
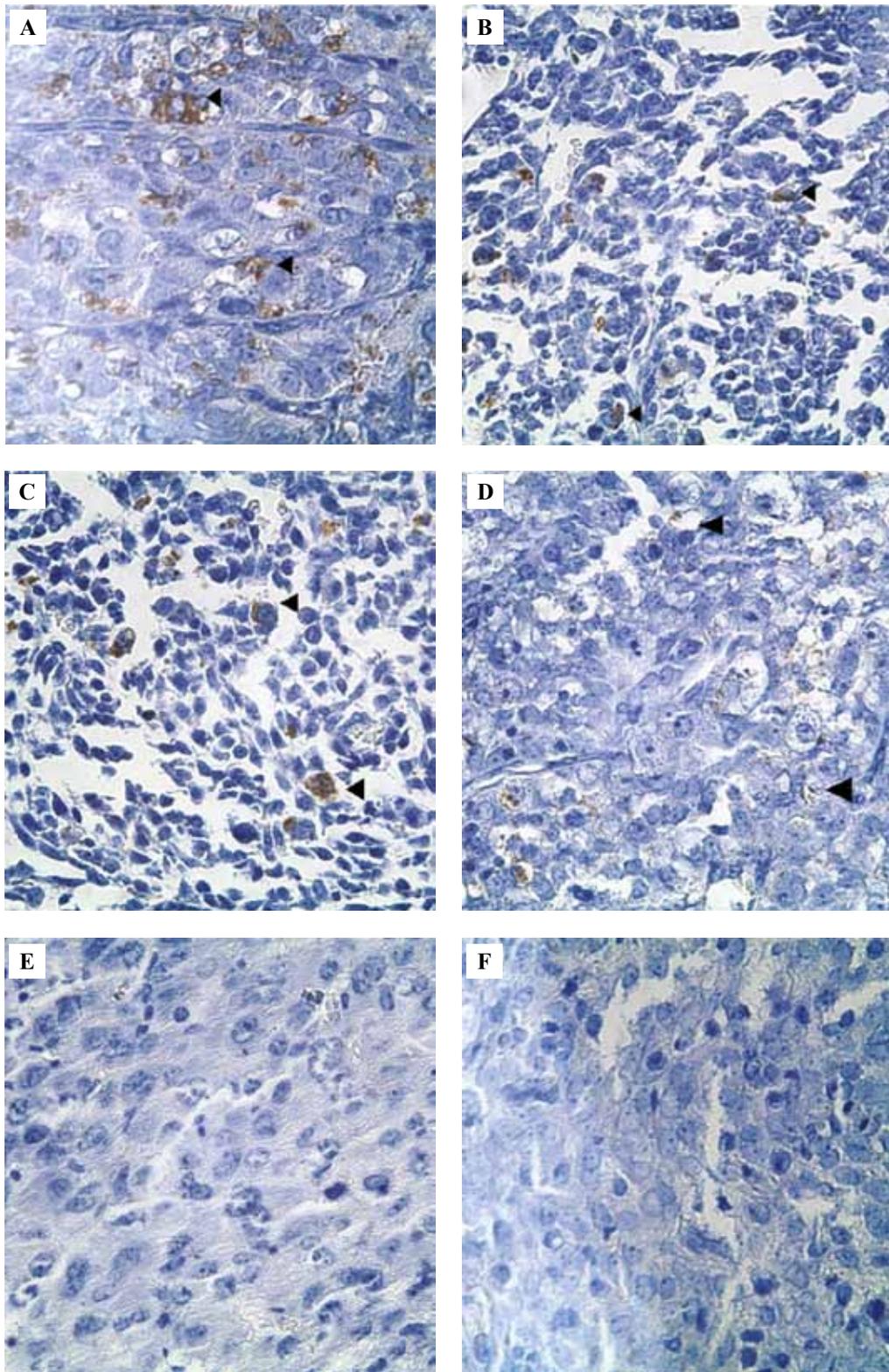


Рис. 2. Сайты имплантации на 8-й день гестации.

А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборты, С, Е – индуцированные аборты, D, F – потенцированные аборты. Сплошные стрелки – мембрана Рейхерта, пунктирные стрелки – эктоплацентарный конус, наконечники стрелок – первичные гигантские клетки трофобласта. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 2. Implantation sites on the gestation day 8.

A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C, E – induced abortion, D, F – potentiated abortion. The solid arrows indicate Reichert's membrane, dotted arrows show an ectoplacental cone, arrowheads demonstrate primary giant trophoblast cells. H&E stain,  $\times 100$



*Рис. 3.* Распределение CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке жизнеспособных (А–D) и резорбированных (Е–F) эмбрионов. А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборты, С – индуцированные аборты, D – потенцированные аборты, Е, F – decidua резорбированных эмбрионов. Наконечники стрелок – CD68<sup>+</sup> клетки. Иммуногистохимическая реакция, ×200

*Fig. 3.* Distribution of CD68 + cells in the decidual membrane of viable (A–D) and resorbed (E–F) embryos. A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C – induced abortion, D – potentiated abortion, E, F – decidua of resorbed embryos. Arrowheads indicate CD68<sup>+</sup> cells. Immunohistochemical assay, ×200

Таблица 2 | Table 2

**Плотность распределения CD68<sup>+</sup> клеток  
в децидуальной оболочке на 1 мм<sup>2</sup>, Me (Q1;Q3) |  
Distribution density of CD68<sup>+</sup> cells  
in the decidua per 1 mm<sup>2</sup>, Me (Q1; Q3)**

Группы   Groups	Децидуальная оболочка жизнеспособных эмбрионов   Decidua of viable embryos	Децидуальная оболочка резорбированных эмбрионов   Decidua of resorbed embryos
Физиологическая беременность   Physiological pregnancy (n=30)	119,29 (89,78; 335,67), 1	0 (0; 0), (0; 0) 5
Спонтанные аборты   Spontaneous abortion (n=24)	110,37 (74,06; 183,86) 2	0 (0; 0), (0; 0) 6
Индукцированные аборты   Induced abortion (n=24)	116,35 (67,11; 184,21) 3	0 (0; 0), (0; 0) 7
Потенцированные аборты   Potentiated abortion (n=23)	108,76 (99,53; 128,85) 4	0 (0; 0), (0; 0) 8
Статистическая значимость   Statistical significance	<p>p1–2=0,524 p1–3=0,396 p1–4=0,526 p2–4=0,751 p3–4=0,588 p5–6=1,000 p5–7=1,000 p5–8=1,000 p6–8=1,000 p7–8=1,000 p1–5=0,031 p2–6=0,015 p3–7&lt;0,001 p4–8&lt;0,001</p>	

являются предшественниками спонгиозной трофобласты плаценты и вторичных гигантских клеток трофобласта [25], воспалительные и дистрофические изменения в МПЕ, нарушения гемоциркуляции в материнских сосудах могут проявиться на более поздних сроках нарушением формирования плаценты и развитием первичной плацентарной недостаточности.

При иммуногистохимическом и морфометрическом исследовании микроокружения эмбриона на 8-й ДГ было установлено, что максимальная медиана плотности CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке характерна для физиологической беременности, минимальная – для потенцированных абортов с наибольшей частотой резорбции по сравнению со спонтанными и индуцированными абортами [24]. Показатели плотности CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке жизнеспособных эмбрионов во всех исследуемых группах статистически

значимо не различались (табл. 2). В микроокружении эмбрионов, находящихся на разных стадиях резорбции, CD68<sup>+</sup> клетки не выявлялись (рис. 3).

Отсутствие различий плотности МФ в децидуальной оболочке жизнеспособных эмбрионов при всех вариантах беременности, как прогрессирующей, так и с высоким уровнем спонтанных и иммунозависимых абортов, позволяет предположить, что выявляемые CD68<sup>+</sup> макрофаги представляют собой популяцию M2, необходимую для благополучного течения беременности. О такой возможности свидетельствует и отсутствие CD68<sup>+</sup> клеток в МПЕ резорбированных эмбрионов. Однако для подтверждения этого необходимо определение фенотипа МФ с применением специфических маркеров. Одним из возможных механизмов эмбриональных потерь, очевидно, является нарушение иммунной толерантности, обусловленное отсутствием альтернативно активированных МФ в маточно-плацентарной единице. Это приводит к активации эффекторов адаптивного иммунитета и цитотоксической атаке на клетки зародыша. Клеточные и молекулярные механизмы, определяющие роль иммунного микроокружения в постимплантационном развитии эмбриона и экстраэмбриональных структур, нарушение которого приводит к прерыванию беременности или формированию плацентарной недостаточности, требуют дальнейшего экспериментального исследования.

## Заключение

Введение иммуномодулятора С7МДП в гестационных сроках 5 и 7 суток (после завершения имплантации и до формирования зрелой плаценты), индуцирующее и потенцирующее аборты у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/c и DBA/2, соответственно, приводит к уменьшению площади маточно-плацентарных единиц, гемоциркуляторным расстройствам в децидуальной оболочке, нарушениям морфогенеза хориона и развития эмбриона вплоть до его полной резорбции, отсутствию CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении резорбированных эмбрионов на 8-й день беременности.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.А. Артемьева, И.М. Богданова, А.Е. Земляков.  
Сбор и обработка материала – К.А. Артемьева, И.М. Богданова, И.И. Степанова, Е.А. Пономаренко, А.А. Степанов.  
Статистическая обработка – К.А. Артемьева.  
Написание текста – К.А. Артемьева, И.М. Богданова.  
Редактирование – М.Н. Болтовская, О.В. Калюжин, С.В. Дамбаева.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova, A.E. Zemlyakov.  
Collected and processed the material – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova, I.I. Stepanova, E.A. Ponomarenko, A.A. Stepanov.  
Performed the statistical analysis – K.A. Artemyeva.  
Wrote the paper – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova.  
Edited the manuscript – M.N. Boltovskaya, O.V. Kalyuzhin, S.V. Dambaeva.

## Литература/References

1. *Matthiesen L, Kalkunte S, Sharma S.* Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(4):334–40. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2012.01121.x.
2. *Baek KH, Lee EJ, Kim YS.* Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med.* 2007;13(7):310–17. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.05.005.
3. *Yin G, Li C, Shan B, Wang W, Chen H, Zhong Y et al.* Insufficient peroxiredoxin-2 expression in uterine NK cells obtained from a murine model of abortion. *J Cell Biochem.* 2011;112(3):773–81. DOI: 10.1002/jcb.22893.
4. *Chen SJ, Liu YL, Sytwu HK.* Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012,258391. DOI: 10.1155/2012/258391.
5. *Kuśnierczyk P.* Killer cell immunoglobulin-like receptor gene associations with autoimmune and allergic diseases, recurrent spontaneous abortion, and neoplasms. *Front Immunol.* 2013;4:8. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00008.
6. *Renaud SJ, Graham CH.* The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest.* 2008;37(5):535–64. DOI: 10.1080/08820130802191375.
7. *Murray PJ.* Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
8. *Marjono AB, Brown DA, Horton KE, Wallace EM, Breit SN, Manuelpillai U.* Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta.* 2003;24(1):100–6. DOI: 10.1053/plac.2002.0881.
9. *Cupurdija K, Azzola D, Hainz U, Gratchev A, Heitger A, Takikawa O et al.* Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51(2):117–22. DOI: 10.1046/j.8755-8920.2003.00128.x.
10. *Svensson-Arvelund J, Ernerudh J.* The role of macrophages in promoting and maintaining homeostasis at the fetal-maternal interface. *Am J Reprod Immunol.* 2015;74(2):100–9. DOI: 10.1111/aji.12357.
11. *Милованов А.П., Ожиганова И.Н.* Эмбриохориальная недостаточность: анатомофизиологические предпосылки, обоснование, дефиниции и патогенетические механизмы. *Архив патологии.* 2014;76(3):4–8.  
*Milvanov AP, Ozhiganova IN.* Embryochorionic insufficiency: anatomic and physiologic prerequisites, rationale, definitions and pathogenetic mechanisms. *Arkhiv Patologii.* 2014;76(3):4–8 (In Russ.).
12. *Monier I, Ancel PY, Ego A, Jarreau PH, Lebeaux C, Kaminski M et al.* Fetal and neonatal outcomes of preterm infants born before 32 weeks of gestation according to antenatal vs postnatal assessments of restricted growth. *Am J Obstet. Gynecol.* 2017;216(5):516.e1–516.e10. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.001.
13. *Salavati N, Smies M, Ganzevoort W, Charles AK, Erwich JJ, Plösch T et al.* The possible role of placental morphometry in the detection of fetal growth restriction. *Front Physiol.* 2019;9:1884. DOI: 10.3389/fphys.2018.01884.
14. *Beune IM, Pels A, Gordijn SJ, Ganzevoort W.* Temporal variation in definition of fetal growth restriction in the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53(5):569–70. DOI: 10.1002/uog.19189.
15. *Carter AM.* Animal models of human placentation. *Placenta.* 2007;28 (Suppl. A.):S41–47. DOI:10.1016/j.placenta.2006.11.002.
16. *Kwak-Kim J, Bao S, Lee SK, Kim JW, Gilman-Sachs A.* Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(2):129–40. DOI: 10.1111/aji.12234.
17. *Papaioannou VE, Behringer RR.* Early embryonic lethality in genetically engineered mice: diagnosis and phenotypic analysis. *Vet Pathol.* 2012;49(1):64–70. DOI: 10.1177/0300985810395725.
18. *Артемяева К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В.* Моделирование индуцированного невынашивания беременности на мышцах с использованием гликозида мурамилдипептида. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2012;2:34–39.  
*Artemyeva KA, Boltovskaya MN, Kalyuzhin OV.* Modelling the immune-dependent miscarriage in mice with the use of a muramyl dipeptide glycoside. *Kursk Scientific and Practical Bulletin «Man and His Health».* 2012;2:34–39 (In Russ.).
19. *Burton GJ, Jauniaux E.* Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S745–S761. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
20. *Ohgiya Y, Nobusawa H, Seino N, Miyagami O, Yagi N, Hiroto S et al.* MR imaging of fetuses to evaluate placental insufficiency. *Magn Reson Med Sci.* 2016;15(2):212–9. DOI: 10.2463/mrms.mp.2015-0051.
21. *Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretzschmar D, Kluge R, Glynn P et al.* Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2004;24(4):1667–79. DOI: 10.1128/MCB.24.4.1667-1679.2004
22. *Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA.* Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase. *J Immunol.* 1998;160(2):545–9.
23. *Knackstedt MK, Zenclussen AC, Hertwig K, Hagen E, Dudenhausen JW, Clark DA et al.* Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2003;49(4):210–20. DOI: 10.1034/j.1600-0897.2003.01192.x.
24. *Артемяева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Калюжин О.В., Степанов А.А. и др.* Особенности иммунного микроокружения в плаценте и gravidарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортми. *Иммунология.* 2019;40(6):26–33. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16004.  
*Artemyeva KA, Bogdanova IM, Stepanova II, Boltovskaya MN, Kalyuzhin OV, Stepanov AA et al.* Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions. *Immunology.* 2019;40(6):26–33 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16004.
25. *El-Hashash AH, Warburton D, Kimber SJ.* Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. *Mech Dev.* 2010;127(1–2):1–20. DOI: 10.1016/j.mod.2009.09.004.

**Информация об авторах**

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Ирина Марковна Богданова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Ирина Ильдаровна Степанова – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Марина Николаевна Болтовская – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Александр Алексеевич Степанов – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Олег Витальевич Калужин – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Александр Евгеньевич Земляков – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической и биологической химии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского.

Светлана Владимировна Дамбаева – кандидат медицинских наук, доцент центра клеточной биологии опухолей, иммунологии и инфектологии Университета медицины и науки им. Розалинд Франклин.

**Author information**

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Irina M. Bogdanova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Irina I. Stepanova – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Alexander A. Stepanov – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-9672-7145>

Oleg V. Kalyuzhin – Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0003-3628-2436>

Alexander E. Zemlyakov – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Organic and Biological Chemistry, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.  
<http://orcid.org/0000-0003-3536-1618>

Svetlana V. Dambaeva – Cand. Sci. (Med.), Research Assistant Professor Center for Cancer Cell Biology, Immunology and Infection, Rosalind Franklin University of Medicine and Science.  
<https://orcid.org/0000-0002-1145-1814>

## Иммуногистохимические особенности каротидного клубочка человека

Д.А. Отлыга<sup>1</sup>, О.А. Юнеман<sup>1</sup>, Е.Г. Цветкова<sup>1</sup>, К.Р. Горохов<sup>2</sup>, С.В. Савельев<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

*Введение.* Каротидный клубочек – хеморецепторный орган, осуществляющий сложную рефлекторную регуляцию деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем млекопитающих. Тем не менее его молекулярно-генетические и иммуногистохимические особенности у человека недостаточно изучены. Хотя имеется много работ второй половины XX века, посвященных классической светооптической гистологии органа, иммуногистохимические исследования каротидного клубочка человека единичны. Цель исследования – охарактеризовать иммуногистохимические особенности каротидного клубочка человека и лабораторных животных.

*Материалы и методы.* Работа выполнена на 10 каротидных клубочках взрослых людей разного возраста обоего пола при помощи иммунопероксидазного маркирования антителами к бIII-тубулину, тирозингидроксилазе, синаптофизину, PGP9.5, нейрофиламентам, S100 и GFAP.

*Результаты.* Нервные волокна, как проходящие между долек, так и входящие в них, были позитивными на бIII-тубулин, тирозингидроксилазу, PGP9.5 и нейрофиламенты. В клетках I типа обнаружена цитоплазматическая реакция на бIII-тубулин и синаптофизин, а также цитоплазматическая и внутриядерная реакция на PGP9.5. При этом в них отмечалась очень слабая реакция на тирозингидроксилазу. Клетки II типа были положительны на GFAP и S100.

*Заключение.* Иммуногистохимические характеристики каротидного клубочка человека сходны с таковыми у крыс и мышей. В клетках и нервных волокнах органа человека маркеры к PGP9.5, бIII-тубулину, синаптофизину, нейрофиламентам, GFAP и S100 показали распределение, аналогичное таковому в каротидных клубочках у крыс и мышей. Однако иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу в каротидном клубочке человека была значительно ниже по сравнению с крысами и мышами, что может свидетельствовать о меньшем объеме синтезируемых катехоламинов.

**Ключевые слова:** каротидный клубочек человека, иммуногистохимия, симпатoadреналовая система, тирозингидроксилаза

**Для корреспонденции:** Дмитрий Александрович Отлыга. E-mail: otlyga@bk.ru

**Для цитирования:** Отлыга Д.А., Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Горохов К.Р., Савельев С.В. Иммуногистохимические особенности каротидного клубочка человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):61–67. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.61-67

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

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

**Статья поступила** 13.05.2020. **Получена после рецензирования** 18.06.2020. **Принята в печать** 29.06.2020.

## Immunohistochemical features of the human carotid body

Д.А. Отлыга<sup>1</sup>, О.А. Junemann<sup>1</sup>, Е.Г. Tsvetkova<sup>1</sup>, К.Р. Gorokhov<sup>2</sup>, S.V. Saveliev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> S.S. Yudin City Clinical Hospital of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

*Introduction.* The carotid body is a chemoreceptor organ and the initial link of the reflex regulation of cardiovascular and respiratory systems. However, molecular genetic and immunohistochemical characteristics of the human carotid body remains underinvestigated. Although there are numerous studies of the second half of the 20th century devoted to the classical light-optical histology of the human organ, the immunohistochemical investigations are very few.

The aim of our study was to clarify immunohistochemical features of the human carotid body in comparison with those of the most commonly used laboratory animals.

*Materials and methods.* The study was performed on 10 carotid bodies of the adult human of different ages of both sexes using immunoperoxidase labeling with antibodies to бIII-tubulin, tyrosine hydroxylase, synaptophysin, PGP9.5, neurofilaments 200kDa, S100, and GFAP.

**Results.** Nerve fibers passing between the lobules, as well as entering them, were positive for bIII-tubulin, tyrosine hydroxylase, PGP9.5 and neurofilaments. Type I cells had cytoplasmic reaction for bIII-tubulin and synaptophysin as well as cytoplasmic and nuclear staining for PGP9.5. At the same time, they had weaker reaction for tyrosine hydroxylase. Type II cells were positive for GFAP and S100.

**Conclusion.** Immunohistochemical characteristics of the human carotid body were similar to those of rats and mice. The human carotid body cells and nerve fibers showed the same distribution of PGP9.5, bIII-tubulin, synaptophysin, neurofilaments, GFAP and S100 as rat and mouse carotid body cells. However, human carotid body reaction for tyrosine hydroxylase was much lower, which may indicate a smaller amount of synthesized catecholamines compared to the carotid body in rats and mice.

**Keywords:** human carotid body, immunohistochemistry, sympathoadrenal system, tyrosine hydroxylase

**Corresponding author:** Dmitry A. Otlyga. E-mail: otlyga@bk.ru

**For citation:** Otlyga D.A., Junemann O.A., Tsvetkova E.G., Gorokhov K.R., Saveliev S.V. Immunohistochemical features of the human carotid body. Clin. exp. morphology. 2020;9(3):61–67 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.61-67

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

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

**Received** 13.05.2020. **Received in revised form** 18.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

## Введение

Каротидный клубочек – один из параганглиев, выполняющий хеморецепторную функцию. Он является афферентным звеном сложной рефлекторной регуляции деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем у млекопитающих [1]. Тем не менее, несмотря на то, что он очень важен, активное молекулярно-генетическое и иммуногистохимическое исследование проводится в основном на лабораторных животных, а каротидный клубочек человека остается недостаточно изученным.

Во второй половине XX века было опубликовано много работ, посвященных классической светооптической гистологии органа [2–7], но иммуногистохимические исследования каротидного клубочка человека единичны [8–11]. При этом некоторые из них выполнены на материале, зафиксированном через 48 часов после смерти человека [9]. Объясняется это тем, что работа с человеческим материалом накладывает ряд ограничений, наиболее важными из которых являются трудности с его получением, а также невозможность избежать аутолитических изменений.

В свою очередь, перенос результатов, полученных на животных моделях, на человека не всегда оправдан. Данные некоторых авторов показывают, что наличие различных рецепторов, субъединиц рецепторов, регуляторных молекул и нейромедиаторов в клетках каротидного клубочка может значительно варьировать в зависимости от возраста, воздействия окружающей среды и изучаемого вида организма [8, 12].

Чтобы восполнить этот пробел, было проведено иммуногистохимическое исследование человеческого каротидного клубочка с применением семи основных маркеров, используемых в нейроморфологических исследованиях.

## Материалы и методы

Работа выполнена на аутопсийном материале, полученном из ГКБ имени С.С. Юдина, Первого МГМУ

им. И.М. Сеченова и ГКБ № 31. Всего в работе использовано 10 каротидных клубочков взрослых людей разного возраста обоего пола (табл. 1), фиксированных в промежутке 7–14 часов после смерти в 10% забуференном формалине «Биовитрум» (Россия).

По данным анамнеза, наличие выраженной хронической гипоксии и хронической дыхательной недостаточности ни у одного из пациентов отмечено не было. Основным заболеванием у одной пациентки стала протяженная ожоговая стриктура пищевода, ишемическая болезнь сердца наблюдалась у двух пациентов, рак молочной железы – у одной пациентки, мультифокальный атеросклероз – у одного пациента, дисциркуляторная энцефалопатия 3-й стадии – у одного пациента, частичная кишечная непроходимость – у одного пациента, опухоль головного мозга – у одного пациента, острое нарушение мозгового кровообращения – у одного пациента, энцефалопатия сложного генеза – у одного пациента.

Таблица 1 | Table 1

### Пол и возраст пациентов | Gender and age of patients

№	Пол   Gender	Возраст, лет   Age, years
1	Ж   F	24
2	М   M	63
3	Ж   F	69
4	М   M	62
5	Ж   F	78
6	М   M	67
7	Ж   F	80
8	М   M	79
9	М   M	68
10	Ж   F	56

Проводили выделение сонных артерий в области бифуркации вместе с окружающими тканями, затем под бинокляром каротидный клубочек отпрепаровывали от окружающих тканей.

Ткань проводили по стандартному протоколу через изопреп «БиоВитрум» (Россия), заливали в Histomix «Биовитрум» (Россия). Тотальные серийные срезы образцов толщиной 6 мкм изготавливали на микротоме Leica RM2245 (Германия). Каждый 20-й срез наклеивали на предметное стекло, депарафинировали, окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином и заключали в синтетическую среду.

Для проведения иммуногистохимических реакций выбирали самые большие по площади срезы каротидных телец. Их депарафинировали, гидратировали и обрабатывали 3% раствором перекиси водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем срезы помещали в раствор Ultra V Block фирмы Thermo Fisher Scientific (США), для демаскировки антигенов предварительно проводили кипячение в цитратном буфере (рН 6,0). Были проведены иммуногистохимические реакции с первичными антителами (табл. 2). Срезы инкубировали с антителами в течение 60 минут при комнатной температуре. В качестве системы детекции применяли набор UltraVision Quanto Detection System фирмы Thermo Fisher Scientific (США).

Для позитивного контроля использовали срезы мозга человека. Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител на раствор фосфатного буфера.

Срезы просматривали в световом микроскопе Leica DM2500 (Германия), фотографировали при помощи камеры LOMO TCA-9.0 (Россия). Цифровые изображения были сохранены в форматах JPEG и TIFF, выравнивание яркости и контраста проводили при помощи

программы Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, США).

При оценке иммуногистохимических препаратов отмечали наличие или отсутствие специфической иммунопозитивной реакции, распределение иммунореактивного материала в строме и паренхиме, внутри клеток (ядерная или цитоплазматическая локализация).

## Результаты

### Световая микроскопия

Каротидный клубочек взрослых людей во всех случаях располагался в области бифуркации общей сонной артерии между волокнами соединительной ткани. Плотная волокнистая соединительная ткань входила в орган, разделяя его на дольки (рис. 1 А). В ней определялось большое количество кровеносных сосудов и нервов. Дольки были представлены скоплением гломерул, содержащих по 10–20 клеток (в среднем 15) (рис. 1 В).

Во всех исследованных случаях клетки I типа имели овальные или округлые ядра, содержали 1–3 ядрышка. Их цитоплазма была светлой, пенистой и эозинофильной, очень часто распадалась на эозинофильные глыбки. Отмечалось наличие трех субтипов клеток I типа: светлого, темного и пикнотического (рис. 1 В).

Клетки II типа имели веретеновидную форму и вытянутые ядра. Они окружали клетки I типа по периферии. Однако из-за большого количества стромальных и шванновских клеток со схожей морфологией, расположенных рядом с гломерулами, различить эти типы клеток не всегда было возможным. Более того, зачастую без иммуногистохимии на стандартной окраске гематоксилином и эозином при поперечном прохождении среза также было сложно отличить эти клетки от клеток I типа (рис. 1 В).

Таблица 2 | Table 2

Характеристика первичных антител |  
Primary antibody characteristics

№	Антиген, вид животного, производитель   Antigen, host species, supplier	Разведение антител   Working dilution
1	βIII-тубулин, кроличьи поликлональные, Abcam (Великобритания)   βIII-tubulin, rabbit polyclonal, Abcam (UK)	1:500
2	PGP9.5, мышинные моноклональные. Thermo Fisher Scientific (США)   PGP9.5, murine monoclonal. Thermo Fisher Scientific (USA)	1:300
3	Нейрофиламенты 200кД, мышинные моноклональные. Merck (Германия)   Neurofilaments 200кД, murine monoclonal. Merck (Germany)	1:160
4	S100, кроличьи поликлональные. Thermo Fisher Scientific (США)   S100, rabbit polyclonal. Thermo Fisher Scientific (USA)	1:1200
5	Тирозингидроксилаза, кроличьи поликлональные. Abcam (Великобритания)   Tyrosine hydroxylase, rabbit polyclonal. Abcam (UK)	1:160
6	GFAP Ab-4, кроличьи поликлональные. Thermo Fisher Scientific (США)   GFAP Ab-4, rabbit polyclonal. Thermo Fisher Scientific (USA)	1:200–1:1000
7	Синаптофизин, мышинные моноклональные. Abcam (Великобритания)   Synaptophysin, murine monoclonal. Abcam (UK)	1:100

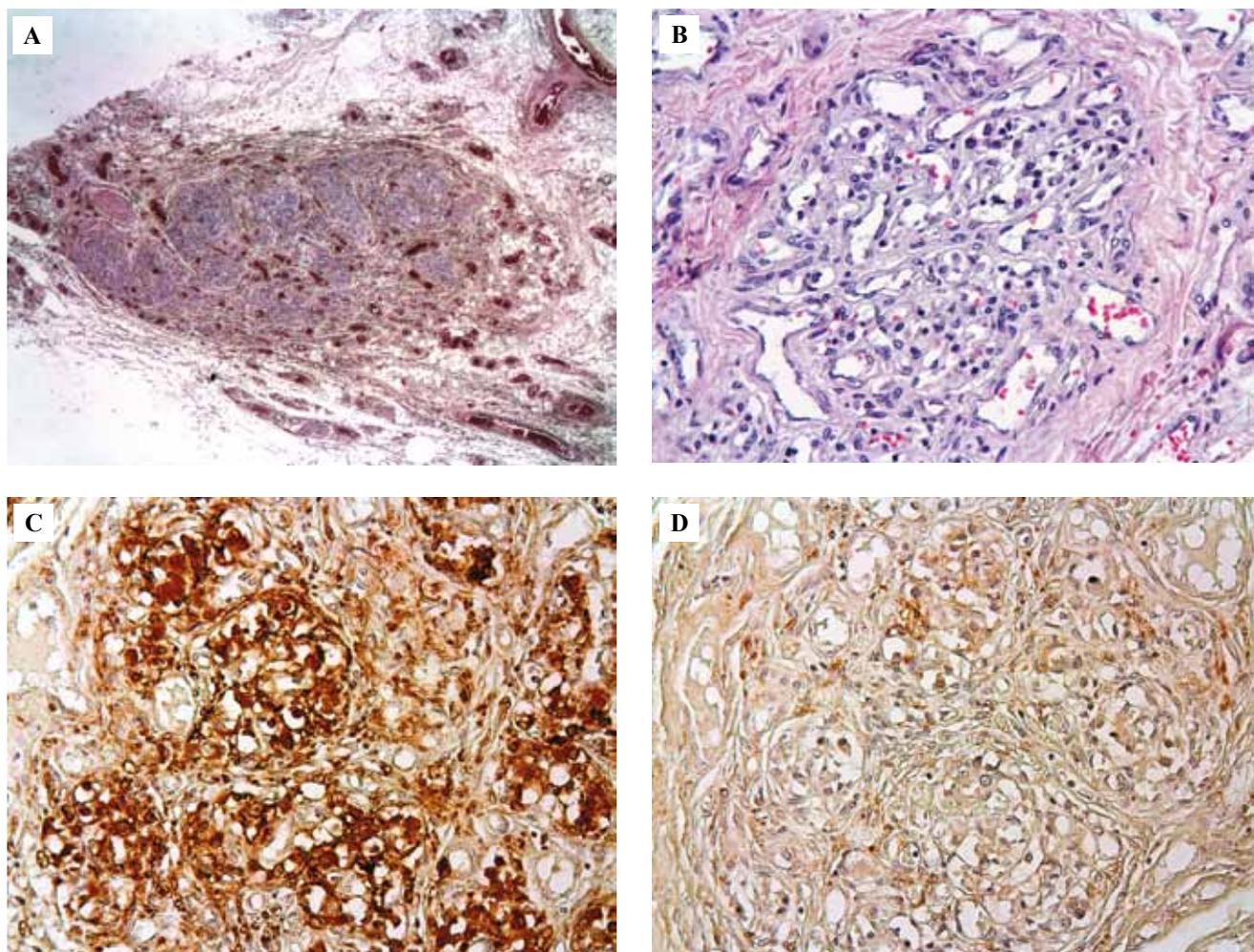


Рис. 1. Каротидный клубочек человека.

А – хорошо заметная дольчатая структура органа. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 10$ . В – при большем увеличении. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ . С – иммуногистохимическая реакция на bIII-тубулин,  $\times 200$ . D – иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу,  $\times 200$

Fig. 1. The human carotid body.

A – organ has lobular structure. H&E stain,  $\times 10$ . B – high magnification. H&E stain,  $\times 200$ .

C – immunohistochemical assay for bIII-tubulin,  $\times 200$ . D – immunohistochemical assay for tyrosine hydroxylase,  $\times 200$

### Иммуногистохимия

Нервные волокна, проходящие между дольками и внутри них, были позитивными на bIII-тубулин, тирозингидроксилазу, PGP9.5 и нейрофиламенты (рис. 1 C, D, 2 A, E).

Клетки I типа давали положительную реакцию на bIII-тубулин (рис. 1 C), PGP9.5 и синаптофизин (рис. 2 A, B). При этом реакция на bIII-тубулин и синаптофизин была цитоплазматической (рис. 1 C), а на PGP9.5 – как цитоплазматической, так и внутриядерной (рис. 2 A). Однако клетки I типа показали очень слабую реакцию на тирозингидроксилазу (рис. 1 D). Отчетливую реакцию на нее демонстрировали лишь единичные клетки, но в случаях № 3 и № 7 количество иммунопозитивных клеток было больше, чем в остальных. Тем не менее даже в этих случаях интенсивность реакции цитоплазмы клеток оказалось низкой.

В клетках II типа реакция на GFAP и S100 была позитивной (рис. 2 C, D). При этом их практически невозможно было отличить от шванновских клеток, которые при схожей морфологии также демонстрировали позитивную реакцию на эти два маркера.

Очень сложно было проследить ход нервных волокон внутри самих гломерул, так как находящиеся в них клетки также позитивны на bIII-тубулин, тирозингидроксилазу и PGP9.5. Поэтому можно было оценить лишь ход нервных волокон, позитивных на нейрофиламенты. Нервные волокна входили в сами гломерулы и формировали промежуточные и концевые утолщения. Эти утолщения образовывали контакты с клетками I типа (рис. 3 A).

Помимо утолщений внутри гломерул часть нервных волокон образовывала утолщения, расположенные рядом со стенкой кровеносных сосудов. Данные утолщения тесно прилежали к их базальной мембране (рис. 3 B).

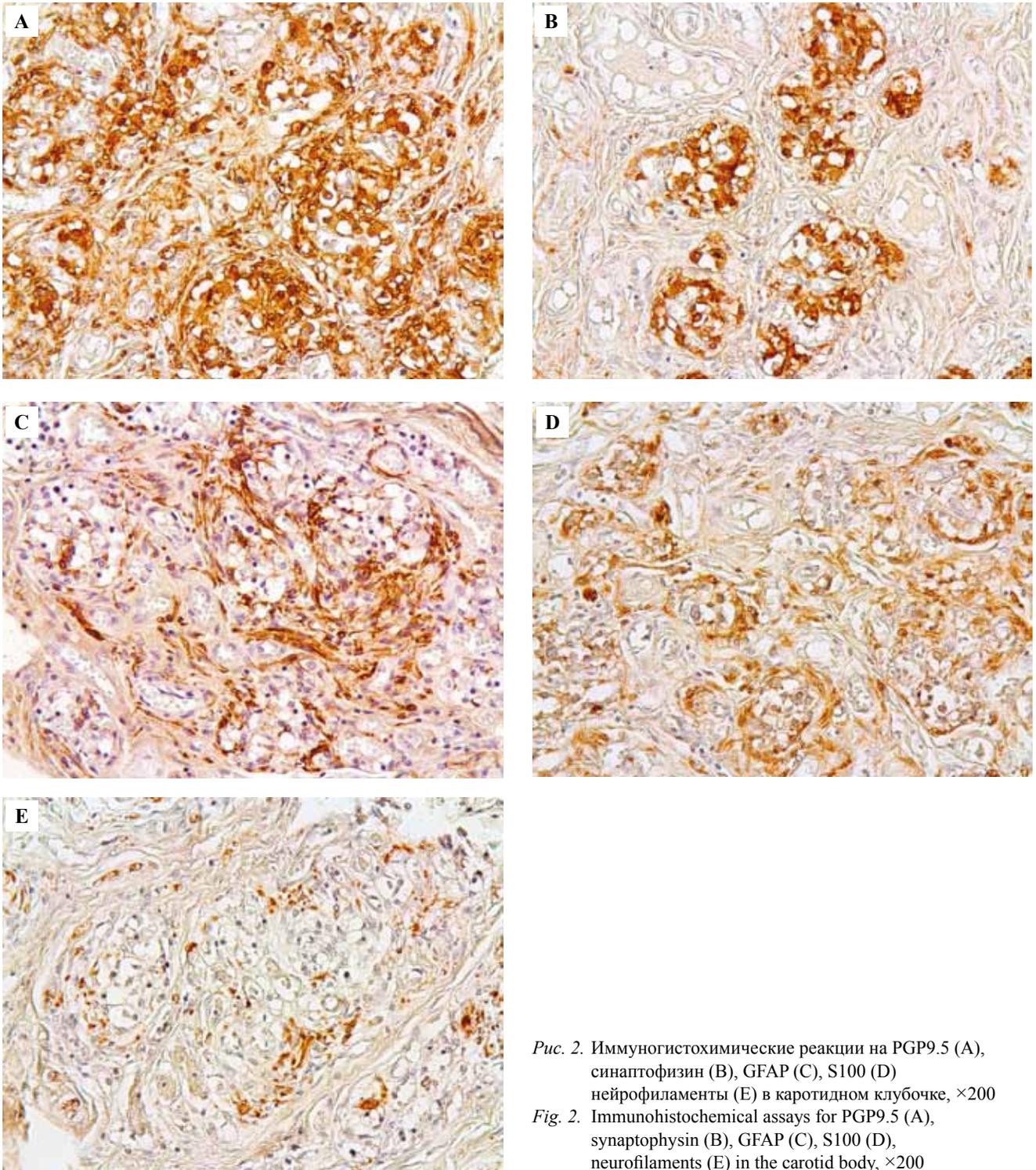


Рис. 2. Иммуногистохимические реакции на PGP9.5 (А), синаптофизин (В), GFAP (С), S100 (D) нейрофиламенты (Е) в каротидном клубочке,  $\times 200$

Fig. 2. Immunohistochemical assays for PGP9.5 (A), synaptophysin (B), GFAP (C), S100 (D), neurofilaments (E) in the carotid body,  $\times 200$

### Обсуждение

Данные, полученные при рутинной окраске гематоксилином и эозином, в целом были сходны с результатами других авторов. Однако стоит отметить, что обнаруживаемые при этой окраске субтипы клеток I типа (светлый, темный, пикнотический) являются ничем иным как артефактом аутолиза и не могут быть диагностическим маркером той или иной патологии, как было установлено нами ранее [13].

При этом по сравнению с каротидным клубочком крыс, орган которых состоит лишь из гнезд клеток [13], у человека он представлял собой скопление гнезд клеток, которые, в свою очередь, образовывали более крупные дольки, отделенные друг от друга прослойками соединительной ткани.

За исключением тирозингидроксилазы иммуногистохимические реакции в человеческом каротидном клубочке были схожими с изученными нами ранее ка-

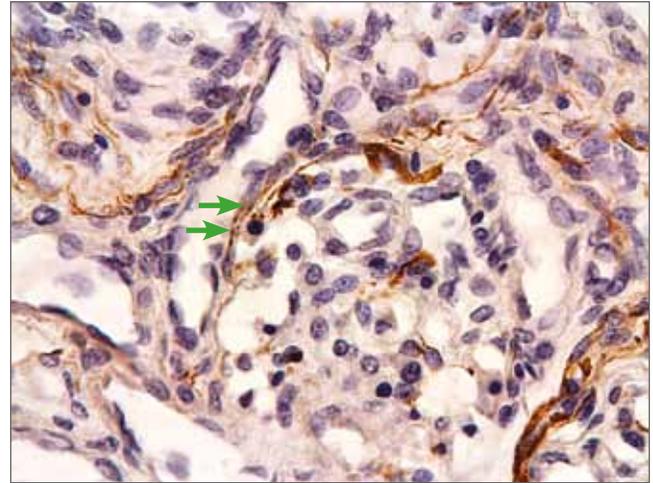
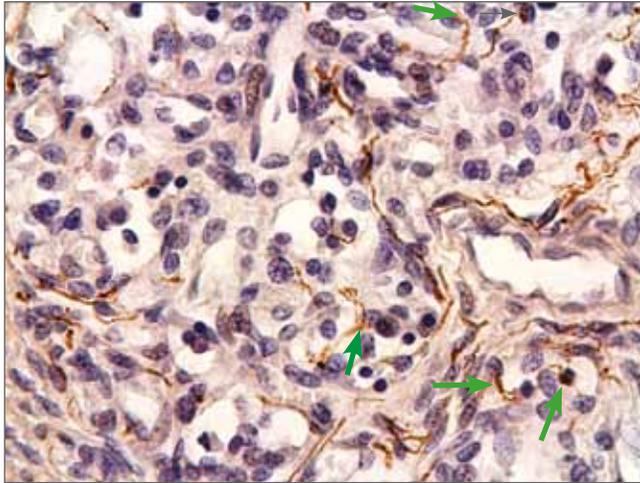


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция на нейрофиламенты. Нервные окончания тесно контактируют с клетками I типа (стрелки) (А), с базальной мембраной капилляра (стрелки) (В),  $\times 400$

Fig. 3. Immunohistochemical assay for neurofilaments. Nerve endings are in close contact with type I cells (arrows) (A), with the basement membrane of the capillary (arrows) (B),  $\times 400$

ротидными клубочками крыс [13]. Как и у крыс, все клетки I типа были положительны на bIII-тубулин, PGP9.5, синаптофизин, шванновские клетки и клетки II типа – на S100 и GFAP, нервные волокна – на bIII-тубулин, PGP9.5 и нейрофиламенты 200кД. Анализ литературы показывает, что в этом плане каротидный клубочек человека сходен с каротидным клубочком не только крыс [13, 14], но и мышей [15].

Тем не менее было отмечено, что количество положительных на тирозингидроксилазу клеток у человека значительно меньше. Если у крыс и мышей отмечалась положительная реакция во всех клетках I типа [13–15], у человека ее показывали лишь единичные клетки. Причем это не является артефактом отсроченной фиксации, так как полученные нами ранее данные свидетельствуют о том, что даже после суточного аутолиза реакция на тирозингидроксилазу не изменяется [13]. Более того, количество положительных на тирозингидроксилазу клеток во взрослом органе оказалось также значительно меньше, чем в незрелых антенатальных каротидных клубочках человека, которые были исследованы нами в предыдущей работе [16].

При этом остается непонятным повышенный (хотя значительно более низкий, чем у крыс и мышей) уровень тирозингидроксилазы в случаях № 3 и № 7. Согласно данным литературы, количество тирозингидроксилазы в органе повышается в ответ на воздействие хронической гипоксии [17]. Однако в этих двух случаях нет никаких данных, свидетельствующих о наличии у пациентов длительной хронической гипоксии.

Маленькое количество позитивных на тирозингидроксилазу клеток может говорить о том, что каротидный клубочек человека продуцирует значительно меньшее количество катехоламинов по сравнению с органами крыс и мышей. В связи с этим можно пред-

положить, что в человеческом каротидном клубочке большую роль играют другие нейромедиаторы, такие как ацетилхолин или АТФ.

### Заключение

Установлено, что иммуногистохимические характеристики каротидного клубочка человека сходны с таковыми у крыс и мышей. В клетках и нервных волокнах органа человека маркеры к PGP9.5, bIII-тубулину, синаптофизину, нейрофиламентам, GFAP и S100 показали распределение, аналогичное распределению в каротидных клубочках крыс и мышей. Тем не менее реакция на тирозингидроксилазу в каротидном клубочке у человека была значительно ниже, что может свидетельствовать о меньшем объеме синтезируемых катехоламинов по сравнению с каротидными клубочками крыс и мышей.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.А. Отлыга, С.В. Савельев. Сбор и обработка материала – Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова, К.Р. Горохов. Написание текста – Д.А. Отлыга. Редактирование – О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова, С.В. Савельев.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.A. Otlyga, S.V. Saveliev. Collected the data and performed the analysis – D.A. Otlyga, O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova, K.R. Gorokhov. Wrote the paper – D.A. Otlyga. Edited the manuscript – O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova, S.V. Saveliev.

### Литература/References

1. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012;2(1):141–219. DOI: 10.1002/cphy.c100069.
2. Heath D, Edwards C, Harris P. Post-mortem size and structure of the human carotid body: Its relation to pulmonary disease and

- cardiac hypertrophy. *Thorax*. 1970;25(2):129–40. DOI: 10.1136/thx.25.2.129.
3. Heath D, Edwards C. The glomic arteries. *Cardiovasc Res*. 1971;5(3):303–12. DOI: 10.1093/cvr/5.3.303.
  4. Smith P, Jago R, Heath D. Anatomical variation and quantitative histology of the normal and enlarged carotid body. *J Pathol*. 1982;137(4):287–304. DOI: 10.1002/path.1711370404.
  5. Jago R, Heath D, Smith P. Structure of the glomic arteries. *J Pathol*. 1982;138(3):205–18. DOI: 10.1002/path.1711380303.
  6. Kubo S, Ogata M, Kitamura O, Tsuda R, Orihara Y, Hirose W *et al*. Immunohistological investigations of autopsied carotid bodies and their application to diagnosing strangulation. *Int J Legal Med*. 1994;106(6):281–4. DOI: 10.1007/BF01224770.
  7. Heath D, Lowe P, Smith P. Mast cells in the human carotid body. *J Clin Pathol*. 1987;40(1):9–12. DOI: 10.1136/jcp.40.1.9.
  8. Fagerlund MJ, Kählin J, Ebberyd A, Schulte G, Mkrtschian S, Eriksson LI. The human carotid body expression of oxygen sensing and signaling genes of relevance for anesthesia. *Anesthesiology*. 2010;113(6):1270–9. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181fac061.
  9. Lazarov NE, Reindl S, Fischer F, Gratzl M. Histaminergic and dopaminergic traits in the human carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165(2–3):131–6. DOI: 10.1016/j.resp.2008.10.016.
  10. Kummer W, Habeck JO. Chemoreceptor A-fibres in the human carotid body contain tyrosine hydroxylase and neurofilament immunoreactivity. *Neuroscience*. 1992;47(3):713–25. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90179-6.
  11. Kummer W, Habeck JO. Substance P- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in the human carotid body studied at light and electron microscopical level. *Brain Res*. 1991;554(1–2):286–92. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90202-7.
  12. Shirahata M, Balbir A, Otsubo T, Fitzgerald RS. Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;157(1):93–105. DOI: 10.1016/j.resp.2006.12.010.
  13. Otyga DA, Junemann OA, Dzhililova DS, Tsvetkova EG, Saveliy SV. Immunohistochemical study of dark and progenitor carotid body cells: Artefacts or real subtypes? *Bull Exp Biol Med*. 2020;168(6):807–11. DOI: 10.1007/s10517-020-04807-8.
  14. Wakai J, Takayama A, Yokoyama T, Nakamuta N, Kusakabe T, Yamamoto Y. Immunohistochemical localization of dopamine D2 receptor in the rat carotid body. *Acta Histochem*. 2015;117(8):784–9. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.07.007.
  15. Kählin J, Eriksson LI, Ebberyd A, Fagerlund MJ. Presence of nicotinic, purinergic and dopaminergic receptors and the TASK-1 K<sup>+</sup>-channel in the mouse carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;172(3):122–8. DOI: 10.1016/j.resp.2010.05.001.
  16. Отыга Д.А., Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Харламова А.С., Бесова Н.В., Савельев С.В. Сонный гломус, мозговое вещество надпочечника и орган Цукеркандля как единая симпатoadrenalовая система в пренатальном развитии человека. *Клин. эксп. морфология*. 2020;9(2):61–69. DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.61-69.
  17. Otyga DA, Junemann OA, Tsvetkova EG, Kharlamova AS, Besova NV, Saveliy SV. Carotid body, adrenal medulla and Zuckerkandl organ as an integrated sympathoadrenal system in human prenatal development. *Clin. exp. morphology*. 2020;9(2):61–69 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.61-69.
  18. Hanbauer I. Molecular biology of chemoreceptor function: induction of tyrosine hydroxylase in the rat carotid body elicited by hypoxia. In: H Acker, S Fidone, D Pallot, C Eyzaguirre, DW Lübbers, RW Torrance (eds.) *Chemoreception in the carotid body*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1977. P. 114–121. DOI: 10.1007/978-3-642-66755-8\_17.

### Информация об авторах

Дмитрий Александрович Отыга – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Ольга Андреевна Юнеман – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Екатерина Глебовна Цветкова – лаборант-исследователь лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Константин Родионович Горохов – патологоанатом, патологоанатомическое отделение ГБУЗ ГБК имени С.С. Юдина.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

### Author information

Dmitry A. Otyga – Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-6719-3383>

Olga A. Junemann – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0001-5828-5393>

Ekaterina G. Tsvetkova – Histotechnologist, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-7943-7760>

Konstantin R. Gorokhov – Pathologist, Pathology Department, S.S. Yudin City Clinical Hospital.  
<https://orcid.org/0000-0001-9014-9068>

Sergey V. Saveliy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

## Хронический гиперсенситивный пневмонит, осложненный острой респираторной вирусной инфекцией

*А.С. Конторщикова<sup>1</sup>, А.Л. Черняев<sup>1,2</sup>, О.А. Васюкова<sup>1</sup>, Ж.Р. Омарова<sup>3</sup>*

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

<sup>2</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Российский национально-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

В статье представлено клиническое наблюдение пациентки 72 лет с хроническим гиперсенситивным пневмонитом в стадии обострения, обусловленного вирусной инфекцией. Во введении приведены литературные данные об этиологии, классификации, частоте встречаемости и возможных осложнениях гиперсенситивного пневмонита. У пациентки при компьютерной томографии (КТ) легких были выявлены двусторонние интерстициальные изменения. На основании клинической и КТ картины ей прижизненно был поставлен диагноз «идиопатический фиброз легких». При патологоанатомическом исследовании аутопсийного материала выявлена морфологическая картина хронического гиперчувствительного пневмонита (облитерирующий бронхиолит, умеренно выраженный интерстициальный фиброз с микросотами, неспецифическая интерстициальная пневмония, гигантские многоядерные клетки) и вирусного поражения легких (экссудативная стадия диффузного альвеолярного повреждения, проявляющаяся внутриальвеолярным отеком, наличием гиалиновых мембран, десквамации альвеолярного эпителия в виде пластов с уродливыми гигантскими клетками).

**Ключевые слова:** гиперчувствительный пневмонит, экзогенный аллергический альвеолит, вирусная инфекция, легкие

**Для корреспонденции:** Олеся Александровна Васюкова. E-mail: o.vas.93@gmail.com

**Для цитирования:** Конторщикова А.С., Черняев А.Л., Васюкова О.А., Омарова Ж.Р. Хронический гиперсенситивный пневмонит, осложненный острой респираторной вирусной инфекцией. Клинический экспериментальная морфология. 2020;9(3):68–73. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.68-73

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

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

Статья поступила 02.06.2020. Получена после рецензирования 16.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Hypersensitivity pneumonitis complicated by acute respiratory viral infection

*A.S. Kontorshchikova<sup>1</sup>, A.L. Chernyaev<sup>1,2</sup>, O.A. Vasyukova<sup>1</sup>, Zh.R. Omarova<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The article presents a clinical case of hypersensitivity pneumonitis complicated by a viral infection in a 72-year-old woman. The introductory part provides a concise literature review on the etiology, classification, frequency, and possible complications of hypersensitivity pneumonitis. The patient's computed tomography (CT) lung scan showed bilateral interstitial lesions. The patient was diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis based on the clinical manifestations and radiological findings. The autopsy revealed morphological signs of hypersensitivity pneumonitis (obliterative bronchiolitis, moderate interstitial fibrosis with honeycombing, nonspecific interstitial pneumonia, giant multinucleated cells) and viral lung damage (exudative stage of acute respiratory distress syndrome with interalveolar edema, hyaline membranes lining the alveoli, pneumocyte desquamation, and ugly giant cells).

**Keywords:** hypersensitivity pneumonitis, exogenous allergic alveolitis, viral infection, lungs

**Corresponding author:** Olesya A. Vasyukova. E-mail: o.vas.93@gmail.com

**For citation:** Kontorshchikova A.S., Chernyaev A.L., Vasyukova O.A., Omarova Zh.R. Hypersensitivity pneumonitis complicated by acute respiratory viral infection. Clin. exp. morphol. 2020;9(3):68–73 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.68-73

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

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

Received 02.06.2020. Received in revised form 16.06.2020. Accepted 29.06.2020.

Гиперсенситивный пневмонит (ГП) (синонимы – гиперчувствительный пневмонит, экзогенный аллергический альвеолит и т.д.) относится к иммунологически обусловленным заболеваниям в ответ на ингаляцию антигенов [1, 2]. Активное исследование ГП началось в середине XX века.

Считается, что ГП развивается у 5–15% лиц, при большой экспозиции высокой концентрации этиологического агента [3–5].

Выявлено более 20 видов ГП, которые были разделены на группы по этиологическим факторам органической (грибковые, бактериальные, белковые антигены животного и растительного происхождения, медикаментозные) и реже неорганической природы [3, 4, 6]. Типы ГП варьируют в зависимости от регионов. Среди всех болезней органов дыхания ГП встречается в 3% наблюдений [4].

Соотношение мужчин и женщин при ГП составляет 1,2:1, болезнь чаще развивается в возрасте от 40 до 60 лет.

По клиническому течению различают острый и хронический гиперсенситивный пневмонит. Ранее существовавшую форму подострого гиперчувствительного пневмонита в настоящее время относят к острой форме. Подострый ГП встречается чаще, ассоциирован с периодическим либо постоянным влиянием антигена и развивается в течение недель или месяцев [7–9]. Подчеркиваются трудности в клинической диагностике ГП, обусловленные отсутствием четких критериев, часть признаков неспецифична и может встречаться при других интерстициальных заболеваниях легких [10].

Гиперчувствительный пневмонит, вызванный ингаляцией различных антигенов, характеризуется интерстициальной инфильтрацией мононуклеарными клетками, наличием некротических гранулем, бронхиолита и фиброза. При морфологической диагностике ГП описана классическая триада признаков: неспецифическая интерстициальная пневмония, облитерирующий бронхиолит, гранулемы без некрозов и/или гигантские многоядерные клетки [11]. Тем не менее постановка диагноза «хронический гиперчувствительный пневмонит» при патологоанатомическом исследовании зачастую сложна. Трудности вызывает дифференциальная диагностика между хроническим гиперчувствительным пневмонитом (ХГП) и идиопатическим легочным фиброзом (гистологически – обычной интерстициальной пневмонией), неспецифической интерстициальной пневмонией и поражениями легких, ассоциированными с системными заболеваниями соединительной ткани [9]. Осложнения ГП обусловлены бактериальной флорой или вирусной инфекцией. При ХГП может развиваться вторичная легочная гипертензия с формированием «легочного» сердца, в редких случаях эмфиземой легких, что приводит к нарастающей дыхательной недостаточности с гипоксией и гипоксемией [12].

В статье представлено клиническое наблюдение хронического гиперсенситивного пневмонита, осложнившегося вирусной инфекцией.

У пациентки А., 72 лет, в 2009 году впервые появились признаки одышки при физической нагрузке и чувство заложенности в груди. При КТ легких были выявлены двусторонние интерстициальные изменения. На основании клинической и КТ картины пациентке поставили диагноз «идиопатический фиброз легких». Назначена терапия системными глюкокортикостероидами, что привело к улучшению клинического состояния, исчезновению одышки. После этого курса гормональной терапии пациентка в течение девяти лет проживала на Кипре, самочувствие ее оставалось хорошим, отрицательной динамики заболевания не было. После возвращения в Россию в октябре 2019 года состояние ухудшилось: вновь появились одышка, общая слабость и малопродуктивный кашель. О проведенном лечении в медицинской карте амбулаторного больного с октября 2019 по март 2020 года не сообщалось. Прогрессирование перечисленных симптомов продолжалось до марта 2020 года, когда наступила биологическая смерть.

В посмертном эпикризе медицинской карты амбулаторного больного указан заключительный клинический диагноз: «Хроническая ишемия головного мозга. Интерстициальное заболевание легких. Язвенная болезнь 12-перстной кишки», без рубрикации.

На аутопсии при макроскопическом исследовании выявлены следующие изменения: поверхность легких мелкобугристая, серо-красного цвета, ткань легких резиновой плотности (рис. 1), масса обоих легких –

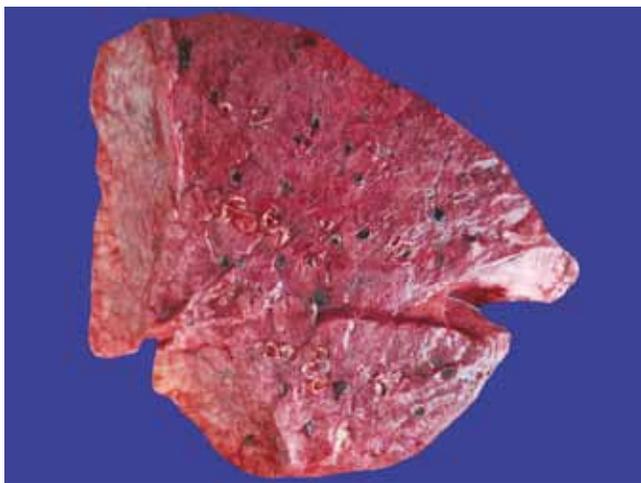


Рис. 1. Макропрепарат: легкое с бугристой поверхностью  
Fig. 1. Gross appearance of the lung: lung with a cobblestoned surface

1860 г. На разрезе ткань легких темно-красного цвета с белесоватыми участками шириной до 1 см под висцеральной плеврой во всех долях легких, с единичными полостями диаметром до 0,3 см (рис. 2). С поверхности разрезов стекала жидкая кровь. В шестых сегментарных ветвях правой и левой легочных артерий выявлены темно-красные обтурирующие тромбы, не связанные с интимой. Сегментарные и субсегментарные бронхи имели тонкую красноватую стенку, не выступали над поверхностью разрезов, в просветах отсутствовал сек-

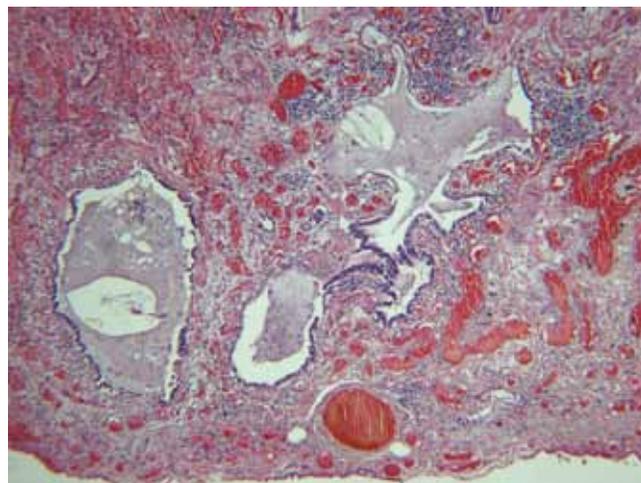
рет. В глубоких венах голени обнаружены обтурирующие темно-красные тромбы.

При микроскопическом исследовании легких выявлены участки умеренно выраженного интерстициального фиброза под висцеральной плеврой (рис. 3) с диффузной лимфоидной инфильтрацией, очаговым ангиоматозом и микросотами, выстланными однорядным кубическим эпителием (рис. 4), в суженных просветах терминальных бронхиол полиповидная фибробластическая ткань (рис. 5) – признак облитерирующей



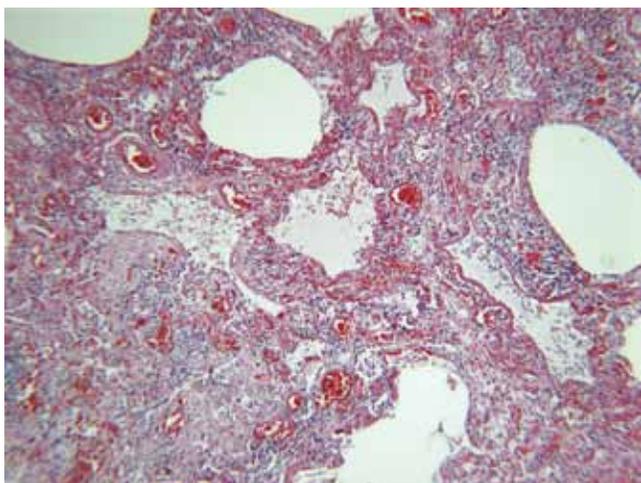
*Рис. 2.* Макропрепарат: безвоздушное уплотненное легкое темно-красного цвета на разрезе

*Fig. 2.* Gross appearance of the airless indurated lung section of dark red color



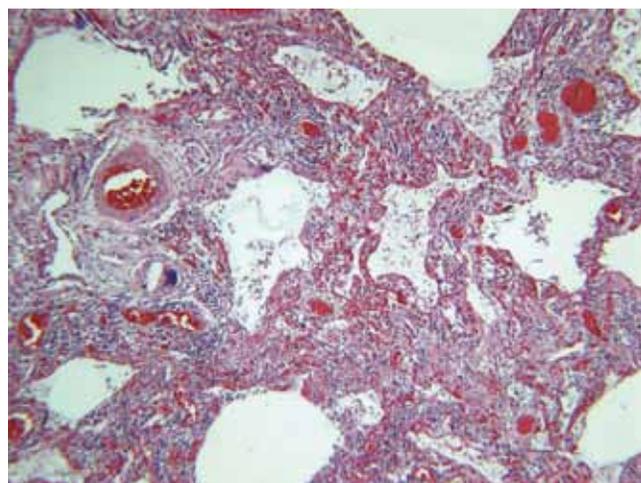
*Рис. 3.* Умеренный подплевральный фиброз с микросотой, слизь в просвете деформированных расширенных терминальных бронхиол, полнокровие сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, ×40

*Fig. 3.* Moderate subpleural fibrosis with honeycombing; deformed expanded terminal bronchioles with mucus in their lumens, hyperemia of the blood vessels. H&E stain, ×40



*Рис. 4.* Интерстициальное воспаление, облитерирующий бронхиолит, гиалиновые мембраны по контурам альвеол, полнокровные расширенных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, ×40

*Fig. 4.* Interstitial inflammation, obliterative bronchiolitis, hyaline membranes lining the alveoli, plethoric dilated vessels. H&E stain, ×40



*Рис. 5.* Интерстициальное воспаление, гиалиновые мембраны по контуру альвеолы и респираторной бронхиолы, гигантская многоядерная клетка в интерстиции. Окраска гематоксилином и эозином, ×40

*Fig. 5.* Interstitial inflammation, hyaline membranes lining the alveoli and respiratory bronchioles, a giant multinucleated cell in the interstitium. H&E stain, ×40

шего бронхиолита, также имело место утолщение части межальвеолярных перегородок за счет лимфоидной инфильтрации (неспецифическая интерстициальная пневмония), были обнаружены единичные расширенные альвеолярные ходы и мешочки с обмелением альвеол (рис. 6). Выявлены мускуляризация стенок артериол с сужением просветов, а также гипертрофия мышечной оболочки части ветвей легочных артерий. На других участках вне зон фиброза наблюдали внутриальвеолярный отек с единичными гиалиновыми мембранами по

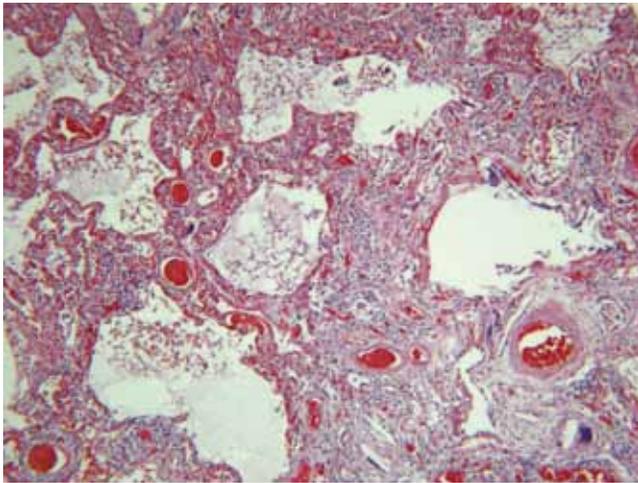


Рис. 6. Интерстициальное воспаление, гиалиновые мембраны, десквамация альвеолярного эпителия, гигантские многоядерные клетки, полнокровие расширенных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 40$

Fig. 6. Interstitial inflammation, hyaline membranes, pneumocyte desquamation, giant multinucleated cells, plethoric dilated vessels. H&E stain,  $\times 40$

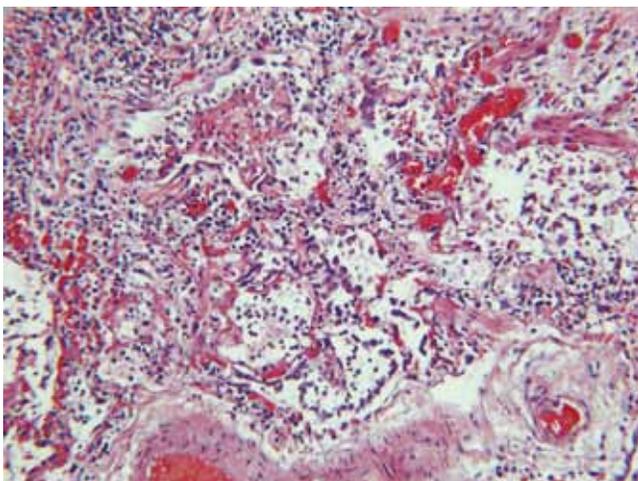


Рис. 7. Десквамация альвеолярного эпителия, единичная гиалиновая мембрана, фибрин в просвете альвеолы, полнокровие сосудов. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 7. Pneumocyte desquamation, single hyaline membrane, interalveolar fibrin, plethoric blood vessels. H&E stain,  $\times 100$

контурам альвеол (рис. 5–7) и респираторных бронхиол 3–10-го порядка, десквамацию эпителия бронхиол и альвеолярного эпителия в виде пластов (рис. 7, 8), местами с наличием уродливых клеток, полнокровие расширенных капилляров и мелких сосудов, встречались гигантские многоядерные клетки с игольчатыми холестериновыми структурами (рис. 8). В одном из просветов ветви легочной артерии обнаружен обтурирующий организующийся тромб.

Описанные гистологические изменения свидетельствовали о наличии у умершей хронического гиперсенситивного пневмонита (облитерирующий бронхиолит, умеренно выраженный интерстициальный фиброз с микросотами, неспецифическая интерстициальная пневмония, гигантские многоядерные клетки) в стадии вирусного обострения – экссудативная стадия диффузного альвеолярного повреждения (внутриальвеолярный отек, гиалиновые мембраны, десквамация альвеолярного эпителия в виде пластов с уродливыми гигантскими клетками).

На основании макро- и микроскопического исследования был сформулирован патологоанатомический диагноз:

«Основное заболевание. J67.8 Хронический гиперсенситивный пневмонит, вирусное обострение в виде диффузного альвеолярного повреждения.

Осложнения. Венозное полнокровие и дистрофия внутренних органов. Обтурирующие тромбы в шестых сегментарных ветвях легочных артерий. Отек головного мозга.

Сопутствующие заболевания. Артериальная гипертензия (масса сердца 390 г, желудочковый индекс = 0,33, толщина миокарда левого желудочка 1,7 см, артери-

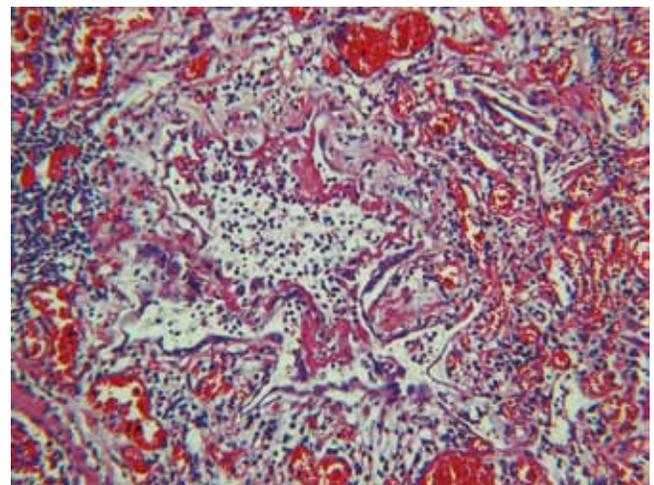


Рис. 8. Гиалиновые мембраны, десквамированный бронхиолярный эпителий, гигантская многоядерная клетка с игольчатыми холестериновыми структурами, полнокровие расширенных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 8. Hyaline membranes, desquamated bronchiolar epithelium, giant multinucleated cell with needle-shaped cholesterol structures, plethoric dilated vessels. H&E stain,  $\times 100$

олонефросклероз). Атеросклероз аорты (IV стадия, 3-я степень), венечных артерий сердца (II стадия, 3-я степень), артерий основания головного мозга (II стадия, 1-я степень).

Непосредственная причина смерти – острая дыхательная недостаточность на фоне хронической».

### Заключение

Особенностью представленного наблюдения является неправильная формулировка клинического диагноза. Причины ошибки – недоучет длительности заболевания (продолжительность течения интерстициальной пневмонии), а также неверная трактовка данных КТ легких и наличие положительного эффекта от лечения пациентки системными глюкокортикостероидами. Недоучет данных анамнеза жизни не позволил выявить этиологический фактор развития заболевания.

В представленном наблюдении течение гиперсенситивного пневмонита осложнилось вирусной инфекцией, сыгравшей роль в танатогенезе заболевания.

### Литература/References

1. Васильева О.С., Чучалин А.Г., Черняев А.Л., Самсонова М.В., Кулемина Е.А. Гиперчувствительный пневмонит, вызванный воздействием металлов-аллергенов. Пульмонология. 2008;4:116–118.  
*Vasilyeva OS, Chuchalin AG, Chernyaev AL, Samsonova MV, Kulemina EA.* Hypersensitive pneumonitis caused by exposure to metal allergens. *Pulmonology.* 2008;4:116–118 (In Russ.).
2. Бабанов С.А., Косарев В.В. Экзогенный аллергический альвеолит: проблемы диагностики. Русский медицинский журнал. 2013;21(7):388–392.  
*Babanov SA, Kosarev VV.* Exogenous allergic alveolitis: problems of diagnostics. *Russian Medical Journal.* 2013;21(7):388–392 (In Russ.).
3. Терехова Е.П. Экзогенные аллергические альвеолиты: современные подходы к диагностике и терапии. Эффективная фармакология. 2013;3(39):40–55.  
*Terekhova YeP.* Extrinsic allergic alveolitis: current approaches to diagnosis and therapy. *Effective Pharmacotherapy.* 2013; 3(39):40–55 (In Russ.).
4. М.М. Илькович, А.Н. Кокосов (ред.). Интерстициальные заболевания легких: Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Нордмед-Издат, 2005. 560 с.
5. Dhooria S, Agarwal R, Sehgal IS, Prasad KT, Garg M, Bal A et al. Spectrum of interstitial lung diseases at a tertiary center in a developing country: A study of 803 subjects. *PLoS One.* 2018;13(2):e0191938. DOI: 10.1371/journal.pone.0191938.
6. Бухтияров И.В., Васильева О.С., Илькович М.М., Кузьмина Л.П., Лашина Е.Л., Орлова Г.П. и др. Профессиональный экзогенный аллергический альвеолит. Клинические рекомендации. 2017. 50 с. Доступно по адресу: <https://www.mrckb.ru/files/FedClin-al.pdf> (21.07.2020).  
*Bukhtiyarov IV, Vasilieva OS, Ilkovich MM, Kuzmina LP, Lashina EL, Orlova GP et al.* Professional exogenous allergic alveolitis. *Clinical guidelines.* 2017. 50 p. (In Russ.). Available at: <https://www.mrckb.ru/files/FedClin-al.pdf> (21.07.2020).
7. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin Chest Med.* 2004;25(3):531–47. DOI: 10.1016/j.ccm.2004.04.001.
8. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(5):661–70. DOI: 10.1067/mai.2001.119570.
9. Takemura T, Akashi T, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Pathology of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med.* 2008;14(5):440–54. DOI: 10.1097/mcp.0b013e3283043dfa.
10. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin J-C, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R et al. Classification of hypersensitivity pneumonitis: a hypothesis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;149(2):161–6. DOI:10.1159/000189200.
11. Katzenstein A-LA, Askin FB, Livolsi VA. Katzenstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease: Volume 13 in the Major Problems in Pathology Series, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997. 487 p.
12. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Демур С.А., Илькович М.М. и др. Диагностика и лечение идиопатического легочного фиброза. Федеральные клинические рекомендации. Пульмонология. 2016;26(4):399–419. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-399-419.  
*Chuchalin AG, Avdeev SN, Aisanov ZR, Belevsky AS, Demura SA, Ilkovich MM et al.* Diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Federal Guidelines. Pulmonologiya.* 2016;26(4):399–419. (In Russ.). DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-399-419.

### Информация об авторах

Андрей Сергеевич Контрощиков – ординатор лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Андрей Львович Черняев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом фундаментальной пульмонологии НИИ пульмонологии, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Олеся Александровна Васюкова – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Жанна Рубеновна Омарова – ассистент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

**Author information**

Andrey S. Kontorshchikov – Resident, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-1032-0353>.

Andrey L. Chernyaev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Fundamental Pulmonology Department, Pulmonology Scientific Research Institute; Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0003-0973-9250>.

Olesya A. Vasyukova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0001-6068-7009>.

Zhanna R. Omarova – Assistant, Department of Pathological Anatomy and Clinical Pathological Anatomy, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-9035-0511>.

## Использование левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при проведении иммуногистохимических реакций

Н.А. Олейникова, О.А. Харлова, Н.В. Данилова, И.А. Михайлов, П.Г. Мальков

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

**Введение.** Проведение иммуногистохимических реакций непрямым методом с хромогенной меткой требует использования ферментов, одним из которых является щелочная фосфатаза (ЩФ). ЩФ присутствует в тканях организма и может расщеплять молекулы иммуногистохимического субстрата, что приводит к выраженному фоновому окрашиванию. Для уменьшения этого эффекта перед постановкой иммуногистохимической реакции необходимо заблокировать эндогенные ферменты. Одним из способов блокировки эндогенной щелочной фосфатазы является использование растворов левамизола. Цель данной работы – описать методику использования левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при проведении иммуногистохимических реакций.

**Материалы и методы.** В статье приводится расчет получения 0,001М рабочего раствора левамизола из 10% официального ветеринарного препарата гидрохлорида левамизола производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A., Испания. Проверка инактивации кишечной формы ЩФ проводилась при постановке реакции с одним маркером (PDGFRb) и двумя маркерами (FAP и SMA) на материале рака толстой кишки. Для выявления двух маркеров на одном срезе нами был использован набор фирмы Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Великобритания) по методике, рекомендованной производителем, с некоторыми изменениями.

**Результаты.** При проведении иммуногистохимической реакции достигнуты полное отсутствие фонового окрашивания и яркая контрастная реакция с антителами (как с одним, так и с двумя на одном срезе) с использованием 1мМ левамизола, что свидетельствует о достаточной инактивации кишечной изоформы ЩФ в материале рака толстой кишки. Проведенный сравнительный анализ затрат на стекло при использовании готовых коммерческих блокирующих реагентов и официального раствора левамизола показывает значительную экономическую выгоду последнего.

**Заключение.** Высокое качество реакции и большая экономическая выгода открывают возможности к применению 1мМ раствора левамизола в практической лабораторной диагностике и научной работе при проведении иммуногистохимических исследований.

**Ключевые слова:** левамизол, иммуногистохимия, щелочная фосфатаза

**Для корреспонденции:** Нина Александровна Олейникова. E-mail: ale\_x\_05@mail.ru

**Для цитирования:** Олейникова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А., Мальков П.Г. Использование левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при постановке иммуногистохимических реакций. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):74–79. DOI:10.31088/СЕМ2020.9.3.74-79

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, грант «Перспектива» № 19-315-60006) и с использованием оборудования, приобретенного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова до 2020 года.

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

Статья поступила 12.05.2020. Получена после рецензирования 17.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Levamisole usage for the block of intestinal alkaline phosphatase in immunohistochemical staining

N.A. Oleynikova, O.A. Kharlova, N.V. Danilova, I.A. Mikhailov, P.G. Malkov

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Introduction.** Immunohistochemical staining by an indirect method with a chromogenic label requires enzymes, among which is alkaline phosphatase (AP). AP is also present in human tissues. It can break down the molecules of the immunohistochemical substrate, which leads to significant background staining. It is necessary to block endogenous enzymes prior to immunohistochemical staining to reduce this effect. One

of the ways to block endogenous alkaline phosphatase is to use levamisole solutions. The aim of the study was to describe the technique of levamisole use to block the alkaline phosphatase intestinal form during immunohistochemical assays.

*Materials and methods.* This article provides the calculations for 0.001M working levamisole solution preparation from a 10% officinal veterinary levamisole hydrochloride produced by Livisto Invesa Industrial Veterinaria S. A., Spain. The inactivation of AP intestinal form was checked by a reaction with one marker (PDGFRb) and two markers (FAP and SMA) on the colon cancer specimens. We used the Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Great Britain) according to the method recommended by the manufacturer with some changes to identify two markers on the same slide.

*Results.* During the immunohistochemical assay, a complete absence of background staining and a bright contrast reaction with antibodies (both with one and two in the same section) using 1mM levamisole was achieved. It indicates sufficient inactivation of the AP intestinal isoform in the colon cancer specimens. A comparative cost-benefit analysis for one slide using ready-to-use commercial blocking reagents and officinal levamisole solution shows a significant economic advantage of the latter.

*Conclusion.* The high reaction quality and the palpable economic profits open up opportunities for using 1mM levamisole solution for immunohistochemical studies in laboratory practice and research work.

**Keywords:** levamisole, immunohistochemistry, alkaline phosphatase

**Corresponding author:** Nina A. Oleynikova. E-mail: ale\_x\_05@mail.ru

**For citation:** Oleynikova N.A., Kharlova O.A., Danilova N.V., Mikhailov I.A., Malkov P.G. Levamisole usage for the block of intestinal alkaline phosphatase in immunohistochemical staining. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2020;9(3):74–79. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.74-79

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR, Perspektiva grant No. 19-315-60006) and using equipment purchased under the development program of Lomonosov Moscow state University until 2020.

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

**Received** 12.05.2020. **Received in revised form** 17.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

## Введение

Проведение иммуногистохимических реакций прямым методом с хромогенной меткой требует использования ферментов. Чаще всего в качестве ферментной метки используются пероксидаза хрена (horseradish peroxidase, HRP), щелочная фосфатаза (ЩФ, alkaline phosphatase, AP) и глюкозооксидаза [1]. Аналогичные ферменты имеются и в тканях организма.

Так, ЩФ – димерный фермент, катализирующий гидролиз фосфоэстераз. У человека существует как минимум четыре типа ЩФ: кишечная (intestinal), плацентарная (placental), зародышевая (germ) и неспецифическая (кости, печень, почки) [2]. Изначально предполагалось, что кишечная изоформа ЩФ экспрессируется преимущественно в тонкой кишке, однако позднее было установлено, что экспрессия кишечной изоформы также в значительной степени характерна и для других органов: экзокринной части поджелудочной железы, коркового слоя почки и ткани печени [3]. Более того, на крысиной модели было установлено, что экспрессия кишечной изоформы ЩФ резко увеличена в аденокарциномах проксимальных и дистальных отделов толстой кишки по сравнению с практически полным отсутствием экспрессии данной изоформы в нормальной ткани толстой кишки [4].

Известно, что аминокислотная последовательность кишечной изоформы ЩФ только на 56,6% идентична последовательности аминокислот неспецифической ЩФ и на 86,5% идентична плацентарной изоформе

ЩФ [5]. Каждая из ЩФ может расщеплять молекулы иммуногистохимического субстрата, в результате чего появляется нежелательное выраженное фоновое окрашивание. Для устранения этого эффекта перед постановкой иммуногистохимической реакции необходимо инактивировать эндогенные ферменты. Для блокировки активности эндогенной пероксидазы применяют различные реактивы на основе перекиси водорода, широко доступные на коммерческом рынке. Для блокировки ЩФ могут быть использованы 20% уксусная кислота, но она повреждает ткани [6], L-аргинин, теофиллин, левамизол, а также производные пурина, пиримидина, тиазола и других гетероциклов [7], используемые в готовых к употреблению коммерческих растворах на рынке. Однако они труднодоступны, не входят в большинство наборов систем детекции, а их цена достаточно высока. В связи с этим нами был протестирован 10% раствор левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. (S, РУ 724-3-9.14-2366, № ПВИ-3-3.9/02832), применяемый в ветеринарии в качестве противоглистного препарата для крупного рогатого скота.

Левамизол ((6S)-6-фенил-2,3,5,6-тетрагидроимидазо[2,1-b][1,3]тазол) – гетероциклическое соединение, производное тиазола, которое является обратимым неконкурентным ингибитором большинства изоформ ЩФ, что впервые было установлено в 1976 году [8]. Левамизол обратимо связывается с гистидином-434 и тирозином-371 в активном центре неспецифической

изоформы ЩФ (рис. 1) [9]. В кишечной изоформе ЩФ гистидин-434, который необходим для связывания левамизола, в активном центре заменен на остаток серина, что и приводит к снижению ингибирующей активности левамизола [9]. Если концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) неспецифической ЩФ для левамизола составляет 23,2 мкмоль/л при pH 7,8, то в случае кишечной изоформы ЩФ аналогичный показатель составляет более 400 мкмоль/л при pH 7,8 [10].

Так как левамизол является обратимым ингибитором, его связывание с аминокислотными остатками в активном центре ЩФ опосредовано нековалентными взаимодействиями, а именно водородными связями, сила которых напрямую зависит от pH среды, что объясняет двукратное снижение активности левамизола в сильнощелочной среде [2].

Молекулярный механизм каталитической реакции с участием ЩФ общий для всех изоформ фермента. Исходная катализируемая реакция ЩФ (обозначена как E на рис. 2) состоит из стадии связывания субстрата (DO-Pi), переноса фосфатного фрагмента в активный центр на остаток серина и выделения спиртового продукта реакции (DOH). Во второй части реакции фосфат высвобождается в результате гидролиза ковалентного промежуточного соединения (E-Pi) и диссоциации неорганического фосфата из нековалентного комплекса (E·Pi). В зависимости от происхождения фермента и точных условий реакции либо гидролиз E-Pi, либо выделение фосфата из E-Pi ограничивает скорость, что приводит к повышенной относительной концентрации E-Pi и E·Pi [11].

В молекуле левамизола атом азота, несущий двойную связь, является аналогом фосфата, который встраивается в активный центр фермента и нековалентно взаимодействует преимущественно с остатком гистидина-434 (в случае неспецифической изоформы ЩФ) [5]. Далее срабатывает типичный механизм обратимого неконкурентного ингибирования: образовавшийся фермент – субстратный комплекс не может перейти в исходное состояние, так как не происходит гидролиза фосфата.

### Материалы и методы

Проверка инактивации кишечной формы ЩФ 10% раствором левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. (Испания) проводилась при постановке реакции с одним маркером (PDGFRb) и двумя маркерами (FAP и SMA) на материале рака толстой кишки. Для выявления двух маркеров на одном срезе нами был использован набор

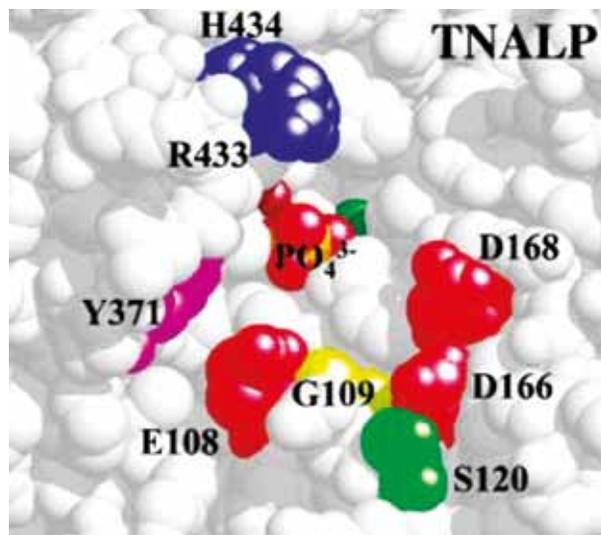


Рис. 1. Область активного центра неспецифической щелочной фосфатазы (TNALP – tissue nonspecific alkaline phosphatase) [9]. Ключевые аминокислотные остатки окрашены в соответствии с их химическими свойствами: синий – основные, фиолетовый – ароматические, желтый – алифатические, зеленый – незаряженный полярный. Атом цинка показан оранжевым, магний – зеленым, а фосфатный фрагмент – желтым и красным

Fig. 1. Active site region of human tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNALP) [9]. The highlighted residues are colored according to their chemical properties: blue – basic, red – acidic, violet – aromatic, yellow – aliphatic, and green – uncharged polar. The zinc atom is shown in orange, the magnesium is in green, and the phosphate moiety is indicated by yellow and red color

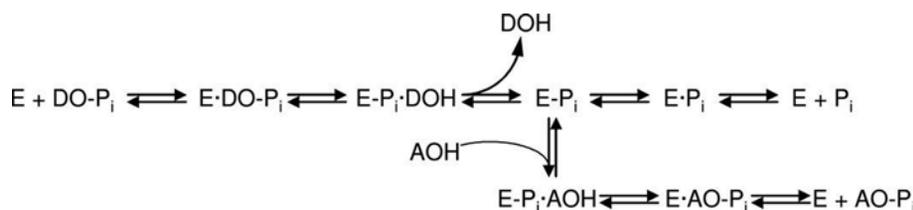


Рис. 2. Каталитический механизм реакции щелочной фосфатазы [10].

Сокращения: E – молекула щелочной фосфатазы, DO-Pi – молекула субстрата, E-Pi – фосфофермент (фермент, фосфорилированный по остатку Ser-93 в активном центре), DOH – спиртовой продукт реакции, E·Pi – нековалентный комплекс неорганического фосфата в активном центре

Fig. 2. Catalytic mechanism of alkaline phosphatase reaction [10].

Abbreviations: E – alkaline phosphatase enzyme molecule, DO-Pi – substrate molecule, E-Pi – phosphoenzyme (enzyme phosphorylated on Ser-93 in the TNAP sequence of its active site), DOH – product alcohol, E·Pi – non-covalent complex of inorganic phosphate in the active site

фирмы Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Великобритания) по методике, рекомендованной производителем [12], с некоторыми изменениями.

С отобранных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Polysine Slides, Menzel GmbH&Co KG, Германия). Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов проводили одновременно, перед блокировкой эндогенных ферментов при помощи буфера Dewax and HIER Buffer M (pH 8,0) (Thermo Scientific, США) при температуре 95–98°C, в течение 20 минут в модуле предобработки PT-Module (Thermo Scientific, США). Иммуногистохимические реакции проводили в полуавтоматическом режиме с использованием автостейнера Autostainer 480S (Thermo Scientific, США).

Фоновое окрашивание предотвращали путем блокирования эндогенных ферментов пероксидазы и ЩФ, используемых в качестве хромогенной метки в полимерных конструкциях вторых слоев. Для блокировки пероксидазы использовали готовый коммерческий раствор Hydrogen Peroxide Block в составе системы детекции Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Scientific, США) со временем инкубации 10 минут. Для блокировки ЩФ вместо готовых растворов для лабораторного использования применили 10% раствор левамизола гидрохлорида. Приводим расчеты получения 0,001M рабочего раствора левамизола (концентрация заведомо большая, для достоверной инактивации кишечной формы ЩФ).

### Результаты и обсуждение

В 1 мл официального 10% раствора содержится 100 мг ( $100 \times 10^{-3}$  г) левамизола гидрохлорида, имеющего молярную массу 240,5 г/моль. Расчет количества действующего вещества в 1 мл готового раствора:

$$\frac{100 \times 10^{-3}}{240,4} = 0,416 \times 10^{-3} \text{ моль.}$$

Исходя из целевой молярности (0,001M) и объема необходимого раствора (10 мл – объем виалы для автостейнера), составляем пропорцию и вычисляем необходимое количество молей (x):

$$\begin{aligned} & 1 \text{ л} - 0,001 \text{ моль,} \\ & 0,01 \text{ л} - x \text{ моль,} \\ \text{где } x &= \frac{0,01 \times 0,001}{1}, \\ & x = 1 \times 10^{-5} \text{ моль} \end{aligned}$$

Учитывая молярность исходного раствора ( $0,416 \times 10^{-3}$ ) и целевого на наш объем ( $10^{-5}$ ), составляем пропорцию и вычисляем необходимый для полу-

чения 10 мл рабочего раствора объем официального раствора (y):

$$\begin{aligned} & 1 \text{ мл} - 0,416 \times 10^{-3} \text{ моль} \\ & y \text{ мл} - 10^{-5} \text{ моль,} \\ \text{где } y &= \frac{10^{-5}}{0,416 \times 10^{-3}}, \\ & y = 0,024 \text{ мл (24 мкл).} \end{aligned}$$

Таким образом, для получения 10 мл раствора необходимо взять:

вода дистиллированная	9,976 мл,
10% раствор левамизола гидрохлорида	0,024 мл.

В автоматическом режиме в автостейнере последовательно проводились:

инкубация с Hydrogen Peroxide Block	10 минут,
инкубация с 0,001M раствором левамизола гидрохлорида	10 минут,
инкубация с антителами	30 минут,
полимеризация (mouse HRP + rabbit AP)	30 минут.

Окрашивание Permanent Red, гематоксилином и Emerald Chromogen осуществлялось в ручном режиме ввиду невозможности смешивания реагентов непосредственно в виале во время процедуры окрашивания в автостейнере. Окрашивание проводилось согласно инструкции производителя с последующим заключением срезов в специальную среду, входящую в набор.

Результаты окрашивания представлены на микрофотографиях, демонстрирующих полное исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной ЩФ 0,001M раствором левамизола гидрохлорида при постановке иммуногистохимических реакций с использованием технологий как хромогенной монометки (рис. 3), так и хромогенной мультиплексной метки (рис. 4).

Учитывая, что максимальный расход реагента на одно стекло – 200 мкл, полученного рабочего раствора объемом 10 мл хватит на 50 определений, а представленной в продаже упаковки официального 10% левамизола объемом 100 мл – на 208 332 стекла:

$$\begin{aligned} & 0,024 \text{ мл официального раствора} - 50 \text{ стекол,} \\ & 100 \text{ мл официального раствора} - z \text{ стекол,} \\ \text{где } z &= \frac{100 \times 50}{0,024}, \\ & z = 208 \text{ 332 стекла.} \end{aligned}$$

Сравнительный анализ стоимости использования 10% левамизола, готового к употреблению коммерче-

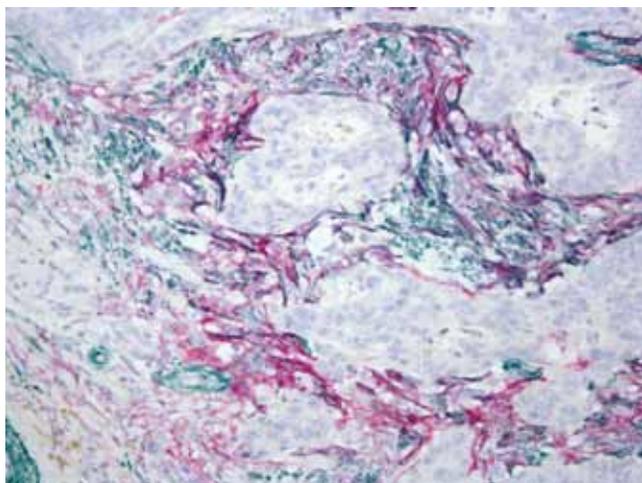


Рис. 4. Исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной щелочной фосфатазы 0,001М раствором левамизола. Иммуногистохимическое определение FAP (красный) и SMA (зеленый) в микропрепарате аденокарциномы толстой кишки,  $\times 200$

Fig. 4. Elimination of background staining by blocking endogenous alkaline phosphatase with 0.001M levamisole solution. Immunohistochemical assay for FAP (red) and SMA (green) in a colon adenocarcinoma,  $\times 200$

ского набора для блокирования эндогенной щелочной фосфатазы и набора для одномоментной блокировки пероксидазы и щелочной фосфатазы показал, что применение левамизола существенно (от нескольких раз до десятков тысяч раз) снижает затраты на проведение иммуногистохимической реакции.

### Заключение

Показана возможность применения 10% официального ветеринарного препарата левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. для инактивации кишечной формы ЩФ в аденокарциноме толстой кишки при постановке иммуногистохимических реакций. Взятая концентрация (1мМ) превышает концентрацию полумаксимального ингибирования (400 мкмоль/л) данной изоформы в 2,5 раза, за счет чего достигаются полное отсутствие фонового окрашивания и яркая контрастная реакция с антителами (как с одним, так и с двумя на одном срезе). Высокое качество реакции и большая экономическая выгода открывают возможности к применению 1мМ раствора левамизола в практической и научной работе при проведении иммуногистохимических исследований.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.А. Олейникова.  
Сбор и обработка материала – Н.А. Олейникова, О.А. Харлова, И.А. Михайлов.  
Написание текста – Н.А. Олейникова.  
Редактирование – О.А. Харлова, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков.

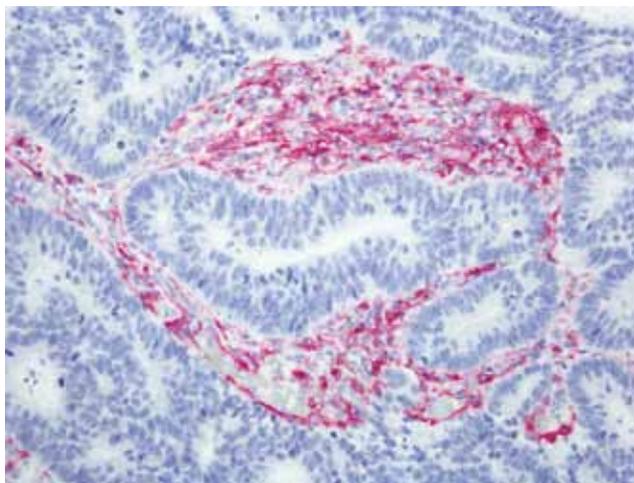


Рис. 3. Исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной щелочной фосфатазы 0,001М раствором левамизола. Иммуногистохимическое выявление PDGFRa (красный) в микропрепарате аденокарциномы толстой кишки,  $\times 200$

Fig. 3. Elimination of background staining by blocking endogenous alkaline phosphatase with 0.001M levamisole solution. Immunohistochemical assay for PDGFRa (red) in a colon adenocarcinoma,  $\times 200$

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.A. Oleynikova.  
Collected the data and performed the analysis – N.A. Oleynikova, O.A. Kharlova, I.A. Mikhailov.  
Wrote the paper – N.A. Oleynikova.  
Edited the manuscript – O.A. Kharlova, N.V. Danilova, P.G. Malkov.

### Литература/References

1. Kierman JA. Histological and histochemical methods. Theory and practice. 4th ed. Banbury: Scion Publishing Ltd, 2008. 606 p.
2. Sergienko E, Su Y, Chan X, Brown B, Hurder A, Narisawa S et al. Identification and characterization of novel tissue-nonspecific alkaline phosphatase inhibitors with diverse modes of action. J Biomol Screen. 2009;14(7):824–37. DOI: 10.1177/1087057109338517.
3. Domar U, Nilsson B, Baranov V, Gerdes U, Stigbrand T. Expression of intestinal alkaline phosphatase in human organs. Histochemistry. 1992;98(6):359–64. DOI: 10.1007/BF00271071.
4. Yoshida K, Nakamura W, Hirano K, Yuasa H, Tsukamoto T, Tatematsu M. Expression of sucrase and intestinal-type alkaline phosphatase in colorectal carcinomas in rats treated with methylazoxymethanol acetate. J Cancer Res Clin Oncol. 1998; 124(12):677–82. DOI: 10.1007/s004320050231.
5. Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA et al. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84(5):1234–8. DOI: 10.1073/pnas.84.5.1234.
6. Bancroft JD, Gamble M (eds.). Theory and practice of histological techniques. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2008. 760 p.

7. *al-Rashida M, Iqbal J.* Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(1):41–51. DOI: 10.2174/1389557515666150219113205.
8. *Van Belle H.* Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem.* 1976;22(7):972–6.
9. *Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniassé P, Ny T, Hoylaerts MF, Millan JL.* Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res.* 2004;19(11):1862–72. DOI: 10.1359/JBMR.040608.
10. *Debray J, Chang L, Marquès S, Pellet-Rostaing S, Le Duy D, Mebarek S et al.* Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(24):7981–7. DOI:10.1016/j.bmc.2013.09.053
11. *Holtz KM, Stec B, Kantrowitz ER.* A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8351–4. DOI: 10.1074/jbc.274.13.8351.
12. Instruction to Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red). Available at: <https://www.abcam.com/doublestain-ihc-kit-mr-on-human-tissue-hrpgreen-apred-ab210061.html>.

### Информация об авторах

Нина Александровна Олейникова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, ассистент кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ольга Андреевна Харлова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Наталья Владимировна Данилова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, ассистент кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Илья Александрович Михайлов – студент 6-го курса факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Павел Георгиевич Мальков – доктор медицинских наук, заведующий отделом клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

### Author information

Nina A. Oleynikova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Assistant Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Olga A. Kharlova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Gene and Cell Technology Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0002-5909-1248>

Natalia V. Danilova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Assistant Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Ilya A. Mikhailov – 6<sup>th</sup> year Student, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Pavel G. Malkov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-5074-3513>

## Марина Николаевна Болтовская

(к 70-летию со дня рождения)

### Marina Nikolaevna Boltovskaya on her 70th birthday

Марина Николаевна Болтовская родилась 7 июня 1950 года в Свердловске. После окончания школы в Москве она поступила на биолого-почвенный факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, где проходила обучение на кафедре цитологии и гистологии, которую возглавляли основатели научных школ в области морфологии и физиологии клетки доктор биологических наук, профессор, лауреат премии имени И.И. Мечникова В.Я. Бродский, а затем доктор биологических наук профессор, дважды лауреат Ломоносовской премии МГУ Ю.С. Ченцов. Циклы лекций по общей и частной гистологии и цитологии там читали ведущие ученые, такие как Н.К. Хрущов, А.Я. Фриденштейн, В.Я. Александров, формировавшие научное мировоззрение студентов.

Окончив биолого-почвенный факультет МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности «физиология человека и животных» (специализация – цитология и гистология), в сентябре 1972 года М.Н. Болтовская поступила на работу в лабораторию цитологии Научно-исследовательского института морфологии человека, с которым неразрывно связаны вся ее научная деятельность и путь от старшего лаборанта до исполняющей обязанности заместителя директора по научной работе (2015–2018). Под руководством доктора медицинских наук, профессора Иосифа Александровича Алова она успешно проводила исследования по изучению механизмов патологии митоза и в 1980 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Развитие статокINETИЧЕСКОЙ реакции при субоптимальной температуре и механизмы ее обратимости» в специализированном диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. С 1984 года Марина Николаевна работала в лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии, которой заведовал крупнейший отечественный иммунолог – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации Борис Борисович Фукс, один из создателей исследовательской группы, которая, опережая аналогичные группы в Европе и США, разрабатывала комплекс проблем новой науки – космической иммунологии. Другим направлением исследований лаборатории стала гибридная биотехнология, определившая дальнейшую деятельность М.Н. Болтовской, возглавившей лабораторию в 1996 году. В результате исследований в 2001 году она защитила докторскую диссертацию «Роль эндометриальных белков и клеток-продуцентов в репродукции человека» по специальности «гистология, цитология,



клеточная биология». В 1991 году М.Н. Болтовская получила ученое звание старшего научного сотрудника по специальности «гистология, цитология, эмбриология», а в 2009 году – профессора по специальности «гистология, цитология, клеточная биология».

В феврале 2016 года Марина Николаевна стала заведующей лабораторией патологии репродукции, объединившей коллективы лабораторий патологии женской репродуктивной системы, клеточной иммунопатологии и биотехнологии и группы иммунодиагностических технологий, многие годы плодотворно сотрудничавших в области изучения механизмов физиологической беременности и ее нарушений, разработки диагностических тест-систем для мониторинга беременности и выявления причин женского и мужского бесплодия.

Результаты научной работы М.Н. Болтовской, связанные с созданием гибридом и получением моноклональных антител против секреторных продуктов эндометрия, имеют приоритетный фундаментальный характер и непосредственный выход в практическое здравоохранение. По материалам исследований опубликовано более 140 научных работ, посвященных проблемам патологии митоза, гибридной биотехнологии, исследованию роли эндогенных гликоконъюгатов в репродукции человека, в том числе три коллективные монографии («Гибридомы и моноклональные антитела в биотехнологии и медицине» (1989), «Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности» под редакцией В.Е. Радзинского, А.П. Милованова (2004) и «Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности» под редакцией А.П. Милованова, О.Ф. Серовой (2011)). М.Н. Болтовская является соавтором пяти патентов Российской Федерации.

Марина Николаевна Болтовская вносит большой вклад в подготовку научных кадров в области клеточной биологии, цитологии и гистологии, выступая рецензентом и оппонентом кандидатских и докторских диссертаций, проводя спецкурс по гибридной биотехнологии для студентов кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Под ее научным руководством успешно защищено шесть кандидатских диссертаций. М.Н. Болтовская – член ученого совета и диссертационного совета Д 001.004.01 при НИИ морфологии человека.

Марина Николаевна активно участвует в общественной жизни института – в разные годы она была председателем проблемной комиссии «Морфогенез клетки, тканей и организма» научного совета по морфологии человека, членом комитета по биоэтике, аттестационной и экзаменационной комиссий. М.Н. Болтовская – ответственный секретарь журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» со времени его основания в 2011 году. Награждена медалью «В память 850-летия Москвы» и Почетной грамотой Российской Академии медицинских наук за плодотворный труд по развитию медицинской науки и здравоохранения.



Коллектив сотрудников Научно-исследовательского института морфологии человека и редакционная коллегия журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» поздравляют Марину Николаевну с юбилеем и желают ей крепкого здоровья, энергии и новых творческих достижений.

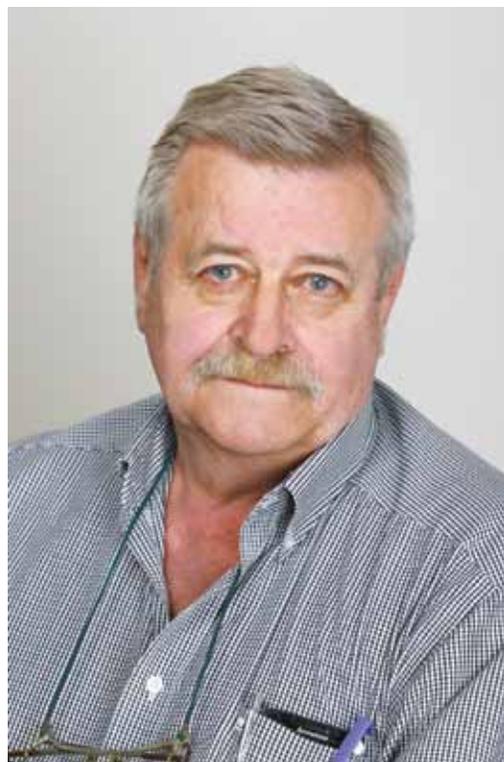
## Андрей Львович Черняев

(к 70-летию со дня рождения)

### Andrey Lvovich Chernyaev on his 70th birthday

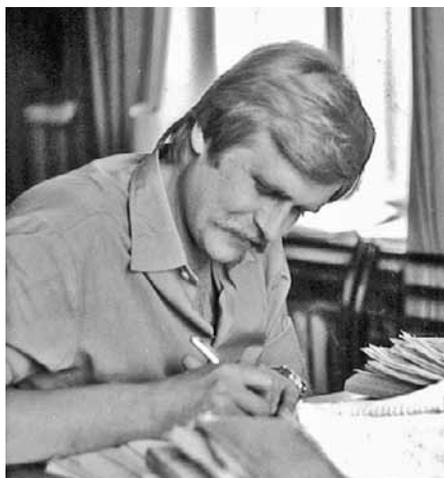
19 августа 2020 года исполнилось 70 лет Андрею Львовичу Черняеву – нашему близкому другу, блестящему ученому, высококвалифицированному врачу-патологоанатому и просто замечательному человеку. Имя профессора А.Л. Черняева тесно связано с Научно-исследовательским институтом морфологии человека, куда в 1974 году после окончания лечебного факультета Второго Московского государственного ордена Ленина медицинского института им. Н.И. Пирогова он поступил в клиническую ординатуру, а затем в 1976 году – в аспирантуру. В 1979 году Андрей Львович под руководством доктора медицинских наук, профессора А.А. Жаворонкова защитил кандидатскую диссертацию на тему «Патологическая анатомия респираторного отдела легких и органометрическая характеристика сердца при диффузном хроническом бронхите и бронхиальной астме (патогистологическое и морфометрическое исследование)». Затем Андрей Львович работал сначала младшим, затем старшим и ведущим научным сотрудником в лаборатории географической патологии. В дальнейшем академиком АМН СССР, профессором, доктором медицинских наук, директором и основателем НИИ морфологии человека АМН СССР А.П. Авцыным А.Л. Черняеву была предложена работа над докторской диссертацией на тему «Патоморфология сердца в условиях Севера», которую он успешно защитил в 1990 году. С этого момента наступил расцвет деятельности доктора медицинских наук А.Л. Черняева, ставшего ярким научным сотрудником, большим ученым, специализирующимся на патологии органов дыхания и сердца. В этот период Андрей Львович стал много рецензировать и оппонировать кандидатские и докторские диссертации и принимать активное участие в различных научных форумах и конференциях. Учитывая тот факт, что А.Л. Черняев наряду с научными разработками параллельно работал в практическом здравоохранении, это дало возможность доктору медицинских наук, а с 1996 года профессору А.Л. Черняеву стать крупным ученым – морфологом-пульмонологом, заняв достойное место в Москве и далеко за ее пределами.

Следующим этапом в карьере профессора Л.А. Черняева явилось руководство с 1991 года лабораторией патологической анатомии, а затем административная работа в должности заместителя директора по научной работе НИИ пульмонологии ФМБА России. После этого он стал заведующим отделом патологии, в 2016 году переименованного в отдел фундаментальной пульмонологии. Несмотря на большую админи-



стративную и научную работу, профессор А.Л. Черняев не терял тесной связи с альма-матер – Научно-исследовательским институтом морфологии человека, продолжая в качестве внешнего совместителя работать в должности ведущего научного сотрудника сначала лаборатории географической патологии, а потом лаборатории клинической морфологии. И в этом плотном графике работы профессор А.Л. Черняев находил время и желание не только участвовать в научных проектах НИИ морфологии человека, но и передавать свой большой опыт прозекторской работы будущим врачам-патологоанатомам – интернам и клиническим ординаторам. В настоящее время многие из них уже стали опытными патологоанатомами, работающими в практическом здравоохранении и в науке. Среди них и я – бывший клинический ординатор и аспирант нашего Института морфологии человека, которая смогла полюбить нашу трудную, но очень интересную специальность «патологическая анатомия» благодаря и одному из моих учителей, профессору Андрею Львовичу Черняеву.

Сегодня профессор, доктор медицинских наук, заслуженный врач Российской Федерации, врач-патологоанатом высшей квалификационной категории А.Л. Черняев является признанным авторитетом в диагностике и научных проблемах, связанных с патологией органов дыхания. Андрей Львович – автор более 550 научных статей, трех атласов по патологии легких, монографии «Патология органов дыхания у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС» в со-



авторстве с академиком РАН, профессором А.Г. Чу-  
чалиным и К. Вуазеном. Результаты научно-исследо-  
вательской работы вошли в виде глав в монографии  
«Патология человека на Севере», «Бронхиальная аст-  
ма», «Хронические обструктивные болезни легких»,

в двух изданиях Национального руководства для врачей  
«Респираторная медицина», в Национальном руковод-  
стве для врачей «Патологическая анатомия».

Под руководством профессора А.Л. Черняева за-  
щищено три докторские и восемь кандидатских дис-  
сертаций. Андрей Львович является членом двух спе-  
циализированных диссертационных советов по защите  
кандидатских и докторских диссертаций.

От всего сердца поздравляем нашего уважаемого  
Андрея Львовича с юбилеем и желаем ему здоровья,  
сил, долгих лет жизни, больших научных побед, инте-  
ресной работы в качестве практикующего врача-пато-  
логоанатома и общественной жизни.

*Л.М. Михалева,  
директор, руководитель лаборатории  
клинической морфологии человека  
НИИ морфологии человека,  
заведующая патологоанатомическим  
отделением ГКБ № 31 ДЗМ,  
доктор медицинских наук, профессор*

# АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ,  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

- Высококачественная однотипная окраска препаратов
- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (окраска по Папаниколау, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:  
АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01, АФОМК-13-ПАП,  
АФОМК-16, АФОМК-16-25

129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;  
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;  
[www.emco.ru](http://www.emco.ru), [www.stainer.ru](http://www.stainer.ru), [emco@bk.ru](mailto:emco@bk.ru)

   
ГРУППА КОМПАНИЙ ЭМКО

