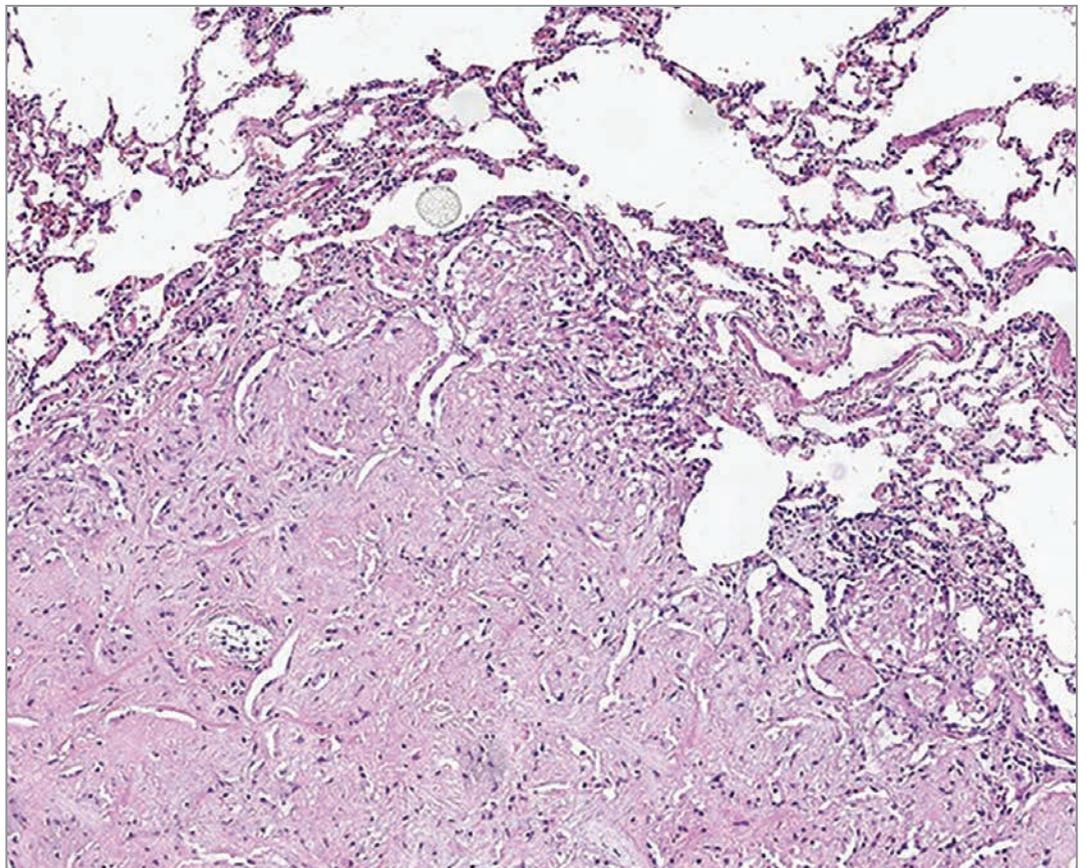


АРХИВ ПАТОЛОГИИ ARKHIV PATOLOGII



2

2022 Том 84

Основан в 1935 г.

Российская академия наук

Российское общество патологоанатомов

«Архив патологии» — научно-практический рецензируемый медицинский журнал. Выходит 6 раз в год Основан в 1935 году

«Arkiv patologii» (Archive of Pathology) is a bimonthly peer-reviewed medical journal published by MEDIA SPHERA Publishing Group. Founded in 1935

Журнал представлен в следующих международных базах данных и информационно-справочных изданиях: РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), Web of Science (BIOSIS Previews, Russian Science Citation Index — RSCI), Scopus/EMBASE, PubMed/Medline, Index Medicus, EBSCOhost, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Архив патологии» включен в Перечень рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендована публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Издательство «Медиа Сфера»:

127238 Москва,
Дмитровское ш., д. 46, корп. 2, этаж 4
Тел.: (495) 482-4329
Факс: (495) 482-4312
E-mail: info@mediasphera.ru
www.mediasphera.ru

Адрес для корреспонденции:

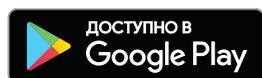
127238 Москва, а/я 54, Медиа Сфера
Отдел рекламы: (495) 482-0604
E-mail: reklama@mediasphera.ru
Отдел подписки: (495) 482-5336
E-mail: zakaz@mediasphera.ru

Адрес редакции:

125284 Москва, ул. Поликарпова, д. 12
Тел.: (495) 946-0217
E-mail: arh.pat@gmail.com
Зав. редакцией И.Н. Соколова

Оригинал-макет изготовлен издательством «Медиа Сфера»
Компьютерный набор и верстка:
О.В. Ненашева, Е.Л. Коган,
Корректор: Е.М. Кулыгина

Рис. на обложке к статье И.В. Двораковской и соавт. «Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких»



Подписной индекс по каталогу «Почты России» ПП289

Подписано в печать 12.04.2022
Формат 60×90 1/8. Тираж 2000 экз.
Усл. печ. л. 10. Заказ 22-Z-0465
Отпечатано в ООО «МЕДИАКОЛОР»

АРХИВ ПАТОЛОГИИ ARKHIV PATOLOGII

Том 84

март—апрель

2'2022

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Г.А. Франк, акад. РАН

А.Ю. Абросимов, д.м.н., проф.

Ю.Ю. Андреева, д.м.н. (отв. секретарь)

Н.М. Аничков, член-корр. РАН

В.П. Быкова, д.м.н., проф.

И.Н. Волошук, д.м.н., проф. (отв. секретарь)

О.В. Зайратьянц, д.м.н., проф.

А.А. Иванов, д.м.н., проф.

Л.В. Кактурский, член-корр. РАН (зам. главного редактора)

А.И. Карселадзе, д.м.н., проф.

А.В. Кононов, д.м.н., проф.

Ю.А. Криволапов, д.м.н., проф.

О.В. Макарова, д.м.н., проф.

П.Г. Мальков, д.м.н., проф.

Г.Н. Маслякова, д.м.н., проф.

А.П. Милованов, д.м.н., проф.

О.Д. Мишнев, д.м.н., проф.

Е.М. Пальцева, д.м.н., проф. РАН

С.А. Повзун, д.м.н., проф.

С.Г. Раденска-Лоповок, д.м.н., проф.

М.В. Рыжова, д.м.н.

Т.А. Федорина, д.м.н., проф.

А.Л. Черняев, д.м.н., проф.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ф. Брэнтон (Бетесда, США)

В. Ениш (Берлин, ФРГ)

Д.Д. Зербино (Львов, Украина)

Ю.Р. Зюзя (Москва)

А. Кваас (Кельн, ФРГ)

А.Г. Коршунов (Гейдельберг, ФРГ)

К. Лапиш (Будапешт, Венгрия)

А. Лломбарт-Бош (Барселона,

Испания)

Б.А. Магрупов (Ташкент,
Узбекистан)

Б. Натвани (Лос-Анджелес,
США)

Ю.Н. Соловьев (Москва)

В.А. Туманский (Запорожье,
Украина)

Д. Хармс (Киль, ФРГ)

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов. Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции. К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов. Направляя статью в редакцию, авторы принимают условия договора публичной оферты. С правилами для авторов и договором публичной оферты можно ознакомиться на сайте: www.mediasphera.ru. Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения издателя — издательства «Медиа Сфера».

**Russian Academy of Medical Sciences
Russian Society of Pathologists**

Founded in 1935

«Arkhiv patologii» (Archive of Pathology)

is a bimonthly peer-reviewed medical journal
published by **MEDIA SPHERA Publishing Group**.

The journal is presented in the following
international databases and information reference
editions: **RSCI (Russian Science Citation Index)**,
**Web of Science (BIOSIS Previews, Russian
Science Citation Index — RSCI)**,
**Scopus/EMBASE, PubMed/Medline, Index
Medicus, EBSCOhost, Ulrich's Periodicals
Directory, Google Scholar.**

**In accordance with the resolution of the Higher At-
testation Commission, Ministry of Education and
Science of the Russian Federation, the journal «Arkh-
iv Patologii» (Archives of Pathology) is included in the
List of Leading Peer-Reviewed Journals and Periodi-
cals issued in the Russian Federation, in which the
main results of Candidate and Doctor Theses are rec-
ommended to be published.**

Media Sfera Publishing Group:

46-2, Dmitrovskoe Sh., Floor 4
Moscow 127238
Phone: 7 (495) 482-4329
Fax: (495) 482-4312
E-mail: info@mediasphera.ru
www.mediasphera.ru

Correspondence address:

Post office box 54, Media Sfera, Moscow 127238
Advertising department:
Phone: 7 (495) 482-0604
E-mail: reklama@mediasphera.ru
Subscription department
Phone: 7 (495) 482-5336
E-mail: zakaz@mediasphera.ru

Address of the Editorial Office:

12, Polikarpov St., Moscow 125284
Phone: 7 (495) 946-0217
E-mail: arh.pat@gmail.com
Managing Editor: I.N. Sokolova



ARKHIV PATOLOGII ARCHIVE OF PATHOLOGY

Volume 84

March—April

2'2022

A BIMONTHLY SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief G.A. Frank,
Acad. of the Russian Academy of Sciences

Prof. A.Yu. Abrosimov, MD
Yu.Yu. Andreeva, MD (Executive Secretary)
N.M. Anichkov, Corr. Member of the Russian Academy of Sciences
Prof. V.P. Bykova, MD
Prof. I.N. Voloshchuk, MD (Executive Secretary)
Prof. O.V. Zairatyants, MD
Prof. A.A. Ivanov, MD
L.V. Kakturskiy, Corr. Member of the Russian Academy of Sciences
(Deputy Editor-in-Chief)
Prof. A.I. Karseladze, MD
Prof. A.V. Kononov, MD
Prof. Yu.A. Krivolapov, MD
Prof. O.V. Makarova, MD
Prof. P.G. Malkov, MD
Prof. G.N. Maslyakova, MD
Prof. A.P. Milovanov, MD
Prof. O.D. Mishnev, MD
Prof. E.M. Paltseva, MD, Prof. of the Russian Academy of Sciences
Prof. S.A. Povzun, MD
Prof. S.G. Radenska-Lopovok, MD
M.V. Ryzhova, MD
Prof. T.A. Fedorina, MD
Prof. A.L. Chernyaev, MD

EDITORIAL REVIEW BOARD

F. Branton (Bethesda, USA)	B.A. Magrupov (Tashkent, Uzbekistan)
V. Enisch (Berlin, FRG)	B. Nathwani (Los Angeles, USA)
D.D. Zerbino (Lvov, Ukraine)	Yu.N. Solovyev (Moscow)
Yu.R. Zyuzya (Moscow)	V.A. Tumansky (Zaporozhye, Ukraine)
A. Kvaas (Cologne, FRG)	D. Harms (Kiel, FRG)
A.G. Korshunov (Heidelberg, FGR)	
K. Lapis (Budapest, Hungary)	
A. Llombart-Bosch (Barcelona, Spain)	

The Editorial Board is not responsible for the content of advertising materials. The opinion of authors may not coincide with that of the editorial board. Only the articles prepared in accordance with the instructions for authors are accepted for publication. When submitting an article to the Editorial Board, the authors accept the terms and conditions of the public offer agreement. The instructions for authors and the public offer agreement can be found on website: www.mediasphera.ru. Complete or partial reproduction of the materials published in the journal is allowed only by written permission of the publisher (MEDIA SPHERA Publishing Group).

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Данилова Н.В., Михайлов И.А., Калинин Д.В., Олейникова Н.А., Чайка А.В., Хомяков В.М., Какоткин В.В., Юдин М.Ю., Вычужанин Д.В., Андреева Ю.Ю., Мальков П.Г.*
Исследование ассоциации аденокарцином желудка с малыми вирусными РНК вируса Эпштейна—Барр 5
- Сальков В.Н., Худоевков Р.М., Воронков Д.Н., Соболев В.Б.*
Морфохимическое исследование альфа-синуклеина, железа и железосодержащих белков в черном веществе головного мозга при болезни Паркинсона 13
- Демяшкин Г.А., Боровая Т.Г., Андреева Ю.Ю., Корякин С.Н., Вадюхин М.А., Шекин В.И.*
Влияние факторов роста тромбоцитов на сперматогенез после облучения электронами 20

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

- Двораковская И.В., Бугров С.Н., Новикова Л.Н., Скрябин С.А., Ариэль Б.М.*
Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких 29
- Воробьева О.М., Ситовская Д.А., Куканов К.К., Эллиниди В.Н., Самусенко И.А., Калинина Н.М., Забродская Ю.М.*
Феномен псевдотуморозной перекрестной иммуногистохимической реактивности глии при прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии 36
- Барина И.В., Волощук И.Н., Чечнева М.А., Коваленко Т.С., Аксенова А.А., Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Бескорвайная Т.С.*
Неразвивающийся частичный пузырный занос в слитной дихориальной плаценте с нормальным развитием второго близнеца 44
- Ахриева Х.М., Коган Е.А., Тертычный А.С., Раденска-Лоповок С.Г., Зайратьянц О.В., Селиванова Л.С.*
Оценка гистологической активности колитов 51

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- Оконечников К.В., Рыжова М.В., Галстян С.А., Тельшева Е.Н.*
Применение технологий секвенирования в педиатрической нейроонкологии 58
- Палкина Н.В., Рукша Т.Г., Хоржевский В.А., Сергеева Е.Ю., Фефелова Ю.А.*
Профилирование экспрессии генов в диагностике меланомы: проблемы и перспективы 64

ОТЧЕТЫ

- Завалишина Л.Э., Васильева А.И., Кузнецова О.А., Скрыпникова К.А., Франк Г.А.*
Итоги работы Центра контроля качества иммуногистохимических исследований ФГБОУ ДПО «РМАНПО» за 2019—2021 гг. 72

ЮБИЛЕЙ

- Карл Георгиевич Башарин. К 80-летию со дня рождения 77

НЕКРОЛОГ

- Памяти Александра Евдокимовича Доросевича 79

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Danilova N.V., Mikhailov I.A., Kalinin D.V., Oleynikova N.A., Chayka A.V., Khomyakov V.M., Kakotkin V.V., Yudin M.Yu., Vychuzhanin D.V., Andreeva Yu.Yu., Malkov P.G.*
Study of gastric adenocarcinomas association with the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs 5
- Salkov V.N., Khudoerkov R.M., Voronkov D.N., Sobolev V.B.*
Morphochemical study of alpha-synuclein, iron and iron-containing proteins in the substantia nigra of the brain in Parkinson's disease 13
- Demyashkin G.A., Borovaya T.G., Andreeva Yu.Yu., Koryakin S.N., Vadyukhin M.A., Shekin V.I.*
Influence of platelets growth factors on spermatogenesis after electronic irradiation 20

GUIDELINES FOR THE PRACTITIONER

- Dvorakovskaya I.V., Bugrov S.N., Novikova L.N., Skryabin S.A., Ariel B.M.*
Pulmonary epithelioid hemangiioendothelioma 29
- Vorobeva O.M., Sitovskaya D.A., Kukanov K.K., Ellinidi V.N., Samusenko I.A., Kalinina N.M., Zabrodskaya Yu.M.*
The phenomenon of pseudotumorous cross immunohistochemical reactivity of glia in progressive multifocal leukoencephalopathy 36
- Barinova I.V., Voloshchuk I.N., Chechneva M.A., Kovalenko T.S., Aksenova A.A., Strelnikov V.V., Kuznetsova E.B., Beskorovaynaya T.S.*
Twin gestation with regressive partial hydatidiform mole and coexisting live fetus 44
- Akhrieva Kh.M., Kogan E.A., Tertychnyi A.S., Radenska-Lopovok S.G., Zayratyants O.V., Selivanova L.S.*
Assessment of histologic activity in colitis 51

REVIEWS OF LITERATURE

- Okonechnikov K.V., Ryzhova M.V., Galstyan S.A., Telysheva E.N.*
Application of high throughput sequencing in pediatric neurooncology 58
- Palkina N.V., Ruksha T.G., Khorzhevskii V.A., Sergeeva E.Yu., Fefelova Yu.A.*
Gene expression profiling in melanoma diagnostics: problems and future application in clinical practice 64

REPORT

- Zavalishina L.É., Vasilyeva A.I., Kuznetsova O.A., Skrypnikova K.A., Frank G.A.*
Results of the work of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education Center for quality control of immunohistochemical studies for 2019—2021. 72

ANNIVERSARY

- Karl Georgievich Basharin. On the occasion of the 80th anniversary of his birth 77

OBITUARY

- In memory of Aleksandr Evdokimovich Dorosevich 79

Исследование ассоциации аденокарцином желудка с малыми вирусными РНК вируса Эпштейна—Барр

© Н.В. ДАНИЛОВА¹, И.А. МИХАЙЛОВ¹, Д.В. КАЛИНИН², Н.А. ОЛЕЙНИКОВА¹, А.В. ЧАЙКА³,
В.М. ХОМЯКОВ³, В.В. КАКОТКИН¹, М.Ю. ЮДИН⁴, Д.В. ВЫЧУЖАНИН⁵, Ю.Ю. АНДРЕЕВА⁶,
П.Г. МАЛЬКОВ^{1, 6}

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Медицинский научно-образовательный центр, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

³Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ООО «СМ-Клиника», обособленное подразделение ООО «СМ-Медика», Москва, Россия;

⁵ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Россия;

⁶ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценка частоты выявления EBV-ассоциированных аденокарцином желудка в выборке российских пациентов, а также уточнение клинико-морфологических характеристик и медианы выживаемости пациентов с EBV-ассоциированным раком желудка.

Материал и методы. В исследовании использованы образцы операционного материала от 282 пациентов с верифицированным диагнозом рака желудка. Каждый образец был окрашен методом гибридизации *in situ* с использованием праймеров к малым вирусным РНК вируса Эпштейна—Барр (EBER). Полученные результаты были сопоставлены с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка.

Результаты. Частота выявления EBV-ассоциированной аденокарциномы желудка в нашей выборке составила 9,57%. Установлено, что EBER-положительные опухоли значительно чаще ($p=0,021$) относятся к промежуточному типу по классификации P. Lauren (66,67%) в сравнении с EBER-отрицательными опухолями (38,82%). EBER-положительные опухоли значительно чаще ($p=0,035$) относятся к опухолям с высокой степенью злокачественности (high grade) — 75,00% в сравнении с EBER-отрицательными опухолями (52,13%). Общая медиана выживаемости всех пациентов с EBER-положительными опухолями была выше (53,5 мес) по сравнению с таковой всех пациентов с EBER-отрицательными опухолями — 36,5 мес ($p=0,5379$). Медиана выживаемости пациентов с EBER-положительными опухолями III стадии также была выше (30,0 мес) по сравнению с аналогичным показателем для пациентов с EBER-отрицательными опухолями — 20,0 мес ($p=0,5622$). Установлено, что отдельно взятый EBER-статус — незначимый прогностический признак (HR=1,0143; ДИ: 0,9897—1,0196).

Заключение. Отдельно взятый EBER-статус не является значимым независимым прогностическим признаком и может рассматриваться только в совокупности с «классическими» клинико-морфологическими характеристиками, в первую очередь со стадией опухолевого процесса, так как именно они определяют прогностические свойства опухоли.

Ключевые слова: EBER, вирус Эпштейна—Барр, EBV-ассоциированная аденокарцинома желудка, рак желудка, гибридизация *in situ*.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Данилова Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Михайлов И.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Калинин Д.В. — <https://orcid.org/0000-0001-6247-9481>

Олейникова Н.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Чайка А.В. — <https://orcid.org/0000-0002-2178-9317>

Хомяков В.М. — <https://orcid.org/0000-0001-8301-4528>

Какоткин В.В. — <https://orcid.org/0000-0003-0352-2317>

Юдин М.Ю. — <https://orcid.org/0000-0002-6600-7825>

Вычужанин Д.В. — <https://orcid.org/0000-0001-6099-1801>

Андреева Ю.Ю. — <https://orcid.org/0000-0003-4749-6608>

Мальков П.Г. — <https://orcid.org/0000-0001-5074-3513>

Автор, ответственный за переписку: Данилова Н.В. — e-mail: natalyadanilova@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Данилова Н.В., Михайлов И.А., Калинин Д.В., Олейникова Н.А., Чайка А.В., Хомяков В.М., Какоткин В.В., Юдин М.Ю., Вычужанин Д.В., Андреева Ю.Ю., Мальков П.Г. Исследование ассоциации аденокарцином желудка с малыми вирусными РНК вируса Эпштейна—Барр. *Архив патологии*. 2022;84(2):5–12. <https://doi.org/10.17116/patol2022840215>

Study of gastric adenocarcinomas association with the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs

© N.V. DANILOVA¹, I.A. MIKHAILOV¹, D.V. KALININ², N.A. OLEYNIKOVA¹, A.V. CHAYKA³, V.M. KHOMYAKOV³, V.V. KAKOTKIN¹, M.Yu. YUDIN⁴, D.V. VYCHUZHANIN⁵, Yu.Yu. ANDREEVA⁶, P.G. MALKOV^{1,6}

¹Lomonosov Moscow State University, Medical Research and Educational Center, Moscow, Russia;

²A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia;

³P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Branch, National Medical Radiology Research Center, Moscow, Russia;

⁴Separate subdivision «SM-Medica» of «SM-Clinic», Moscow, Russia;

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

⁶Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

ABSTRACT

Objective. Assessment of the incidence of EBV-associated gastric adenocarcinomas in a sample of Russian patients, as well as clarification of the clinical and morphological characteristics and median survival of patients with EBV-associated gastric cancer.

Material and methods. We used samples of surgical material from 282 patients with a verified diagnosis of gastric cancer. Each sample was stained by in situ hybridization using primers for the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBER). The results obtained were compared with the main clinical and morphological characteristics of gastric cancer.

Results. The detection rate of EBV-associated gastric adenocarcinoma in our sample was 9.57%. EBV-positive tumors much more often ($p=0.021$) belong to the intermediate type according to the P. Lauren classification (66.67%) in comparison with EBV-negative tumors (38.82%). EBV-positive tumors significantly more often ($p=0.035$) belong to high-grade tumors — 75.00% in comparison with EBV-negative tumors (52.13%). The overall median survival of all patients with EBV-positive tumors (53.5 months) was higher compared to the overall median survival of all patients with EBV-negative tumors — 36.5 months ($p=0.5379$). The median survival of patients with EBV-positive stage III tumors (30.0 months) was also higher compared to that for patients with EBV-negative tumors — 20.0 months ($p=0.5622$). It was found that a single EBER status is not a significant prognostic factor (HR=1.0143; CI: 0.9897—1.0196).

Conclusion. Separately taken EBER-status is not a significant independent prognostic factor and can be considered only in conjunction with the «classical» clinical and morphological characteristics, primarily with the stage of the tumor process, since it is they that determine the prognostic properties of the tumor.

Keywords: EBER, Epstein-Barr virus, EBV-associated gastric adenocarcinoma, gastric cancer, in situ hybridization.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Danilova N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Mikhailov I.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Kalinin D.V. — <https://orcid.org/0000-0001-6247-9481>

Oleynikova N.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Chayka A.V. — <https://orcid.org/0000-0002-2178-9317>

Khomyakov V.M. — <https://orcid.org/0000-0001-8301-4528>

Kakotkin V.V. — <https://orcid.org/0000-0003-0352-2317>

Yudin M.Yu. — <https://orcid.org/0000-0002-6600-7825>

Vychuzhanin D.V. — <https://orcid.org/0000-0001-6099-1801>

Andreeva Yu.Yu. — <https://orcid.org/0000-0003-4749-6608>

Malkov P.G. — <https://orcid.org/0000-0001-5074-3513>

Corresponding author: Danilova N.V. — e-mail: natalyadanilova@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:

Danilova NV, Mikhailov IA, Kalinin DV, Oleynikova NA, Chayka AV, Khomyakov VM, Kakotkin VV, Yudin MYu, Vychuzhanin DV, Andreeva YuYu, Malkov PG. Study of gastric adenocarcinomas association with the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):5–12. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol2022840215>

EBV-ассоциированная аденокарцинома желудка выделяется многими исследователями в отдельный молекулярный подтип в связи с наличием в опухолевых клетках латентных форм EBV [1]. Идентификация кодируемых EBV малых вирусных РНК (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs, EBER) методом гибридизации *in situ* (EBER-ISH), по мнению большинства авторов [2, 3], является золотым стандартом для установления ассоциации аденокарциномы желудка с EBV.

При использовании EBER-ISH подавляющее большинство опухолевых клеток EBV-ассоциированных аденокарцином желудка демонстрирует выраженную положительную реакцию [2]. Однако частота выявления EBV-ассоциированных аденокарцином желудка от общего числа

аденокарцином желудка варьирует, по данным разных авторов, от 2 до 18%, что является довольно большим разбросом и, вероятно, зависит от расовых и популяционных характеристик исследуемой группы [4]. Известно, что частота выявления EBV-ассоциированных аденокарцином желудка в популяции Северной Америки составляет 9,9%, в азиатской популяции — 8,3%, в европейской — 9,2% [5]. Стоит отметить, что исследование распространенности EBV-ассоциированных аденокарцином желудка на выборках пациентов из Российской Федерации не проводилось.

Согласно исследованию TCGA, EBV обнаруживается в злокачественных эпителиальных клетках в 9% случаев рака желудка [6]. Помимо идентификации методом EBER-ISH

авторы также использовали секвенирование мРНК и микроРНК. Результаты, полученные с помощью обоих методов, оказались идентичны. Также было установлено, что наиболее часто встречающимся типом генетических нарушений в клетках EBV-ассоциированных аденокарцином является множественное метилирование CpG-островков, что позволяет выделять эту группу опухолей в качестве отдельного молекулярного подтипа [6]. Более того, выявленные отличия между профилями метилирования EBV-ассоциированного подтипа и подтипа, ассоциированного с микросателлитной нестабильностью (MSI), также объясняют разницу между этими группами по мутационному профилю. EBV-ассоциированные опухоли имели более высокую распространенность гиперметилирования ДНК, чем любые виды рака, а именно гиперметилирование промотора гена *CDKN2A*, но не имели гиперметилирования *MLH1*, характерного для MSI-ассоциированного рака желудка [6]. Также для EBV-ассоциированных опухолей в 80% случаев характерны соматические мутации гена *PIK3CA*, в 55% случаев — гена *ARID1A* и в 23% — гена *BCOR*, однако при этом частота возникновения мутаций гена *TP53* значительно ниже по сравнению с другими молекулярными подтипами [6].

Известно, что и EBV- и MSI-ассоциированные опухоли характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-L1 и, следовательно, эффективно реагируют на иммунотерапию блокаторами PD-L1 [7]. Другой примечательной особенностью EBV-ассоциированного рака желудка является меньшая частота обнаружения метастазов в лимфатических узлах, но в то же время большая глубина инвазии слоев стенки желудка по сравнению с другими подтипами рака желудка на момент постановки диагноза [8]. У большинства пациентов с EBV-ассоциированным раком желудка диагностируется уже продвинутая стадия (в 52% случаев III и IV стадия) опухолевого процесса, и 49% пациентов умерли в течение среднего периода наблюдения, составившего 3 года [9]. Нескорректированный регрессионный анализ Кокса показал, что медиана выживаемости пациентов с EBV-ассоциированным раком желудка составляет 8,5 года, тогда как медиана выживаемости пациентов с EBV-негативными опухолями желудка — всего 5,3 года [9]. На этом основании считается, что прогноз и эффективность лечения пациентов

с EBV-ассоциированным раком желудка более благоприятны [10, 11]. Однако вместе с тем многими авторами [2, 3, 9] поднимается вопрос о необходимости уточнения этих данных, поскольку они были получены в результате выполнения сетевого метаанализа путем сопоставления исследований, проведенных на разных популяциях с неодинаковыми исходными характеристиками, в том числе по соотношению в выборках различных клинических стадий.

Цель исследования — оценить частоту выявления EBV-аденокарцином желудка в выборке российских пациентов, а также уточнить клинико-морфологические характеристики и медианы выживаемости пациентов с EBV-ассоциированным раком желудка по сравнению с пациентами с EBV-негативными формами рака желудка.

Материал и методы

В исследовании были использованы образцы операционного материала от 282 пациентов с верифицированным диагнозом рака желудка. Средний возраст пациентов составил 63 года (минимальный 22 года; максимальный 84 года). Половозрастные характеристики выборки пациентов и распределение по стадиям опухолевого процесса представлены в табл. 1.

Каждый образец был окрашен методом гибридизации *in situ* с использованием праймеров к малым вирусным РНК вируса Эпштейна—Барр (INFORM EBER, Roche Ventana, США) и системы визуализации ISH iVIEW Blue Detection Kit (Roche Ventana, США). Постановка реакций гибридизации *in situ* осуществлялась с помощью прибора Ventana BenchMark Ultra (Roche Ventana, США).

Результаты реакций оценивали в соответствии с общепринятыми стандартами [12, 13]. Реакция считалась положительной, если сигнал EBER был локализован в ядре опухолевых клеток, но при этом отсутствовало цитоплазматическое окрашивание за исключением случаев митоза, при которых ядерная мембрана утрачивает свою целостность [12]. При каждой постановке реакции в обязательном порядке использовали положительный контроль в виде тканевого образца EBV-ассоциированной назофарингеальной карциномы.

Таблица 1. Половозрастные характеристики выборки пациентов, распределение по стадиям опухолевого процесса

Table 1. Sex and age characteristics of the sample of patients, distribution by stages of the tumor process

Возраст, лет	Мужчины	Женщины	Итого
22—40	5	7	12
41—50	16	9	25
51—60	47	25	72
61—70	45	45	90
71—80	38	40	78
81 и старше	1	4	5
Всего	152	130	282
Клиническая стадия	Мужчины	Женщины	Итого
IA	17	20	37
IB	15	10	25
IIA	15	6	21
IIB	17	18	35
IIIA	25	20	45
IIIB	24	20	44
IIIC	22	14	36
IV	17	22	39
Всего	152	130	282

Полученные результаты были сопоставлены с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка. При сопоставлении результатов со степенью злокачественности по Классификации ВОЗ 2019 г. из анализа были исключены перстневидно-клеточные раки, так как в соответствии с этой классификацией степень злокачественности оценивается только для тубулярных и папиллярных аденокарцином желудка. Прогностическая значимость изучаемых признаков оценивалась по общей 5- и 8-летней выживаемости пациентов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием анализа таблиц сопряженности, критерия хи-квадрат, непараметрических критериев для парного и множественного сравнений, анализа выживаемости по Каплану—Мейеру, логрангового критерия, многофакторного анализа выживаемости в регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса (Statistica 10, StatSoft, Inc., США).

Результаты и обсуждение

По результатам идентификации EBER в опухолевых клетках из 282 исследованных случаев рака желудка 27

(9,57%) оказались EBER-положительными и 255 (90,43%) EBER-отрицательными (рис. 1). Таким образом, частота выявления EBV-ассоциированной аденокарциномы желудка в нашей выборке составила 9,57%.

Полученное значение частоты выявления согласуется с данными, установленными при исследовании европейской популяции другими авторами [6].

При сопоставлении результатов с клинико-морфологическими характеристиками рака желудка, а именно с глубиной инвазии опухоли, установлено, что большинство EBER-положительных аденокарцином характеризовалось глубиной инвазии T4a и T4b — суммарно 16 случаев (табл. 2), однако это преобладание не являлось статистически значимым ($p=0,752$) по сравнению с группой EBER-отрицательных опухолей вследствие значительного преобладания в выборке случаев с глубиной инвазии T4a и T4b.

При сопоставлении результатов идентификации EBER с количеством метастазов в регионарных лимфатических узлах установлено, что EBER-положительные случаи были равномерно распределены среди всех групп опухолей: опухоли N0 — 9 случаев, N1 — 4, N2 — 7 и опухоли N3a-N3b — 7 случаев (см. табл. 2).

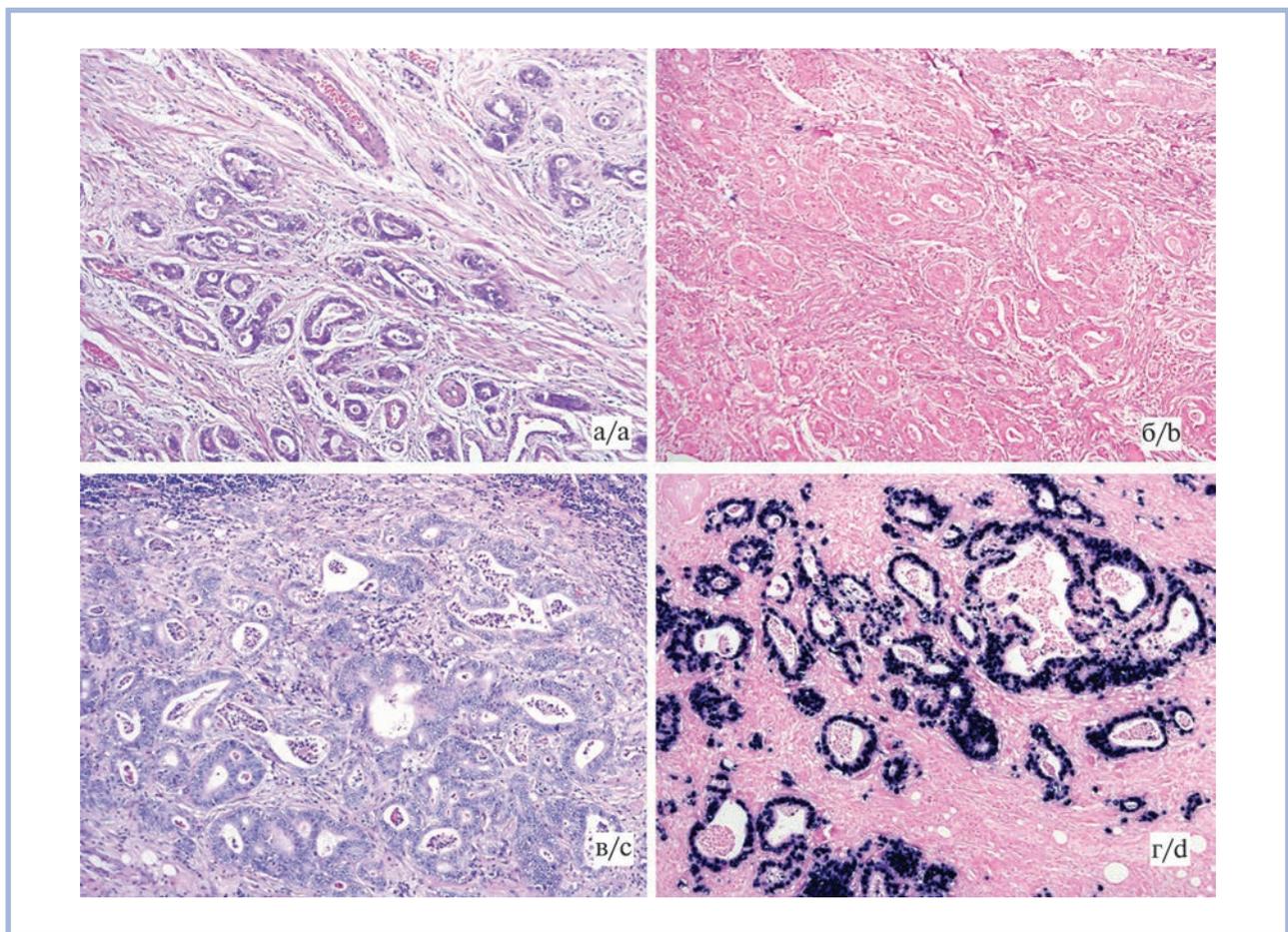


Рис. 1. Экспрессия EBER в аденокарциномах желудка.

а, в — высокодифференцированные аденокарциномы желудка; б — отсутствие экспрессии EBER в опухоли; г — экспрессия EBER в опухоли. а, в — окраска гематоксилином и эозином, об. $\times 10$; б, г — выявление EBER методом гибридизации *in situ*, об. $\times 10$.

Fig. 1. EBER expression in gastric adenocarcinomas.

а, в — gastric adenocarcinomas, low grade; б — EBER-negative adenocarcinoma; г — EBER-positive adenocarcinoma. а, в — H&E, lens magn. $\times 10$; б — EBER *in situ* hybridization, lens magn. $\times 10$.

Таблица 2. Статистическая значимость различий по EBER-статусу в разрезе клинико-морфологических характеристик рака желудка**Table 2.** Statistical significance of differences in EBER status in the context of the clinical and morphological characteristics of gastric cancer

Клинико-морфологические характеристики	Число EBER-положительных случаев	Число EBER-отрицательных случаев	Значимость различий по EBER-статусу
Глубина инвазии (Т)	27	255	$p=0,752$
В том числе:			
Т1а — Т1б	5	41	
Т2	2	31	
Т3	4	43	
Т4а — Т4б	16	140	
Метаастазы в регионарных лимфатических узлах	27	255	$p=0,174$
В том числе:			
N0	9	79	
N1	4	52	
N2	7	30	
N3а—N3б	7	94	
Отдаленные метастазы (М)	27	255	$p=0,667$
В том числе:			
M0	24	219	
M1	3	36	
Клиническая стадия	27	255	$p=0,315$
В том числе:			
I (IA, IB)	7	55	
II (IIA, IIB)	2	54	
III (IIIA, IIIB, IIIC)	15	110	
IV	3	36	
Эмболы в лимфатических сосудах	27	255	$p=0,371$
В том числе:			
есть	11	127	
нет	16	128	
Эмболы в кровеносных сосудах	27	255	$p=0,499$
В том числе:			
есть	3	41	
нет	24	214	
Гистологический тип по Laugen	27	255	$p=0,021$
В том числе:			
кишечный	6	93	
промежуточный	18	99	
диффузный	3	63	
Степень злокачественности, ВОЗ, 2019 [14]	24	188	$p=0,035$
В том числе:			
high grade	18	98	
low grade	6	90	

При сопоставлении результатов идентификации EBER с количеством отдаленных метастазов установлено, что большинство EBER-положительных опухолей — 24 случая (см. табл. 2) характеризовалось отсутствием отдаленных метастазов (M0), однако это преобладание не являлось статистически значимым ($p=0,667$) по сравнению с группой EBER-отрицательных опухолей.

Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися данными о том, что EBV-ассоциированные аденокарциномы желудка, как правило, имеют значительную глубину инвазии, но низкое количество метастазов в лимфатических узлах и отдаленных метастазов [8].

При сопоставлении результатов идентификации EBER со стадиями опухолевого процесса установлено, что большинство EBER-положительных опухолей относилось к группе со стадией III (см. табл. 2) — 15 (55,56%) случаев из 27, однако это преобладание не являлось статистиче-

ски значимым ($p=0,315$) по сравнению с группой EBER-отрицательных опухолей.

Среди EBER-положительных опухолей в одинаковой степени встречались как опухоли с наличием эмболов в лимфатических сосудах — 11 случаев, так и с их отсутствием — 16 случаев (см. табл. 2). Однако в то же время среди EBER-положительных опухолей преобладали опухоли с отсутствием эмболов в кровеносных сосудах — 24 (88,87%) случая из 27, однако данное превосходство не являлось статистически значимым ($p=0,499$) по сравнению с группой EBER-отрицательных опухолей.

Установлено, что EBER-положительные опухоли значительно чаще ($p=0,021$) относятся к промежуточному типу по классификации P. Laugen (табл. 2, рис. 2, а) — 18 (66,67%) случаев из 27 в сравнении с EBER-отрицательными опухолями — 99 (38,82%) из 255. Эта выявленная характеристика EBER-положительных опухолей хо-

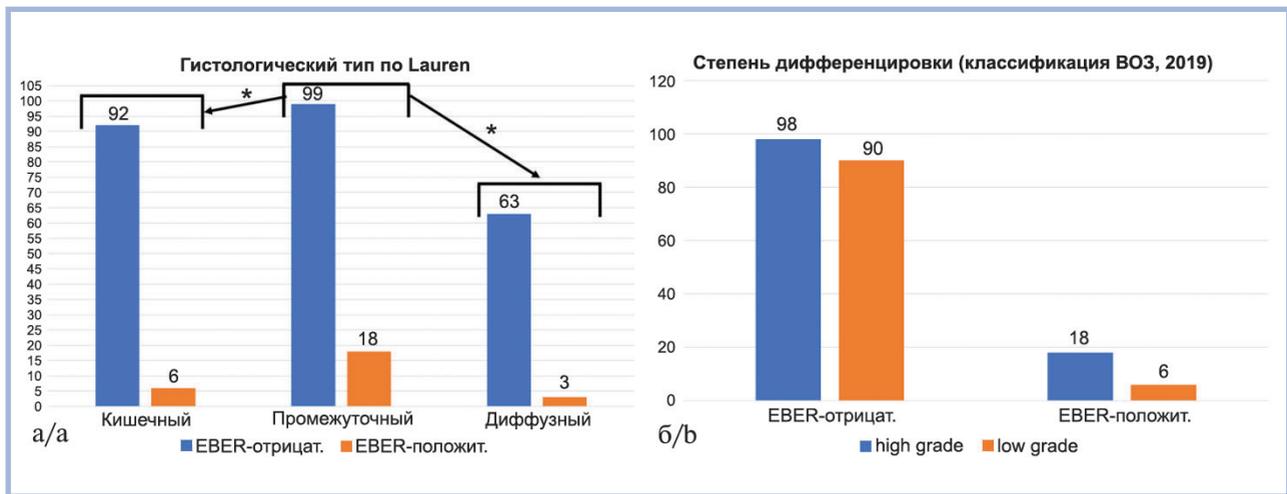


Рис. 2. Выявленные различия аденокарцином желудка по EBER-статусу в зависимости от гистологического типа по P. Lauren (а) и степени злокачественности (б) (ВОЗ, 2019).

Fig. 2. Differences in gastric adenocarcinomas by EBER status depending on the histological type according to P. Lauren (a) and the grade of malignancy (b) (WHO, 2019).

Таблица 3. Медианы выживаемости пациентов в разрезе клинических стадий опухолевого процесса и EBER-статуса

Table 3. Median patient survival in the context of the clinical stages of the tumor process and EBER status

Клиническая стадия	Число случаев	Медиана выживаемости, мес	Значимость различий по EBER-статусу
Все клинические стадии	230	38,0	$p=0,5379$
В том числе:			
EBER-положительные	22	53,5	
EBER-отрицательные	208	36,5	
Из них:			
опухоли I—II стадии	93	75,0	$p=0,4799$
EBER-положительные	7	80,0	
EBER-отрицательные	86	75,0	
опухоли III стадии	107	21,0	$p=0,5622$
EBER-положительные	14	30,0	
EBER-отрицательные	93	20,0	
опухоли IV стадии	30	12,5	$p=0,8006$
EBER-положительные	1	13,0	
EBER-отрицательные	29	12,0	

рошо согласуется с тем фактом, что EBV-ассоциированные аденокарциномы желудка склонны к быстрой инвазии слоев стенки желудка до подслизистой основы [8].

Также установлено, что EBER-положительные опухоли значительно чаще ($p=0,035$) относятся к опухолям с высокой степенью злокачественности (high grade) в соответствии с Классификацией ВОЗ 2019 г. (см. табл. 2, рис. 2, б) — 18 (75%) случаев из 24 в сравнении с EBER-отрицательными опухолями — 98 (52,13%) из 188.

В целях уточнения различий в выживаемости пациентов с EBER-положительными и EBER-отрицательными опухолями желудка были рассчитаны медианы выживаемости пациентов как для всей выборки, так и в разрезе по стадиям опухолевого процесса (табл. 3). Также был проведен анализ 5- и 8-летней выживаемости пациентов по Каплану—Мейеру.

Установлено, что общая медиана выживаемости всех пациентов с EBER-положительными опухолями (53,5 мес) была выше по сравнению с таковой всех пациентов с EBER-

отрицательными опухолями — 36,5 мес (см. табл. 3). Анализ общей 5- и 8-летней выживаемости пациентов не выявил статистически значимых различий (рис. 3, а, б) — минимальное p -значение логрангового критерия составило 0,5379.

При проведении анализа выживаемости в разрезе отдельных стадий установлено, что медиана выживаемости пациентов с EBER-положительными опухолями I—II стадии составила 75,0 мес, что совпадает с медианой выживаемости пациентов с EBER-отрицательными опухолями I—II стадии (см. табл. 3). Анализ общей 5- и 8-летней выживаемости пациентов не выявил статистически значимых различий (рис. 3, в, г) — минимальное p -значение логрангового критерия составило 0,4799.

Медиана выживаемости пациентов с EBER-положительными опухолями III стадии (30,0 мес) была выше по сравнению с аналогичным показателем для пациентов с EBER-отрицательными опухолями — 20,0 мес (см. табл. 3). Однако анализ общей 5- и 8-летней выживаемости пациентов не выявил статистически значимых разли-

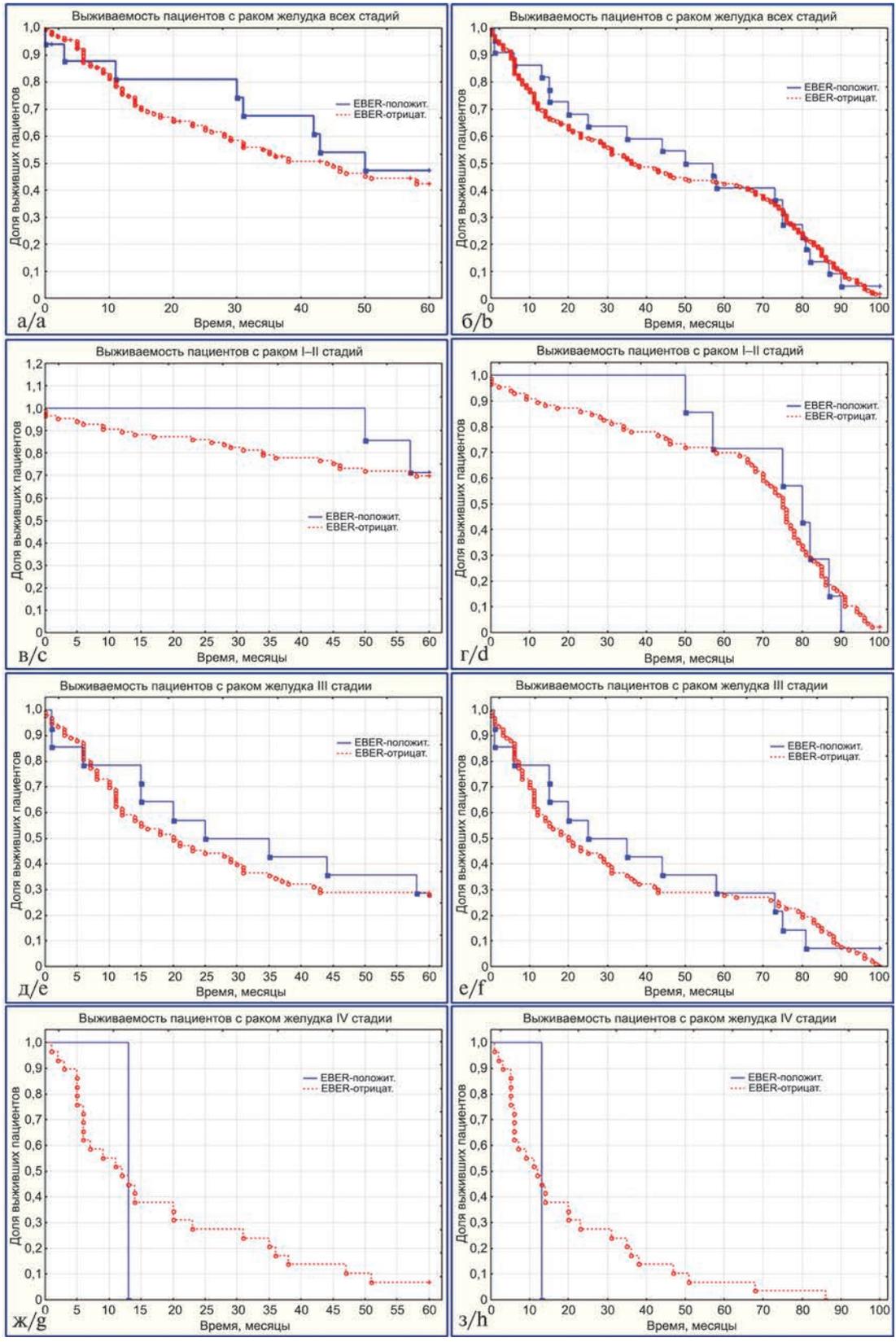


Рис. 3. Анализ выживаемости пациентов с раком желудка различных клинических стадий в зависимости от EBER-статуса (объяснение в тексте).

Fig. 3. Analysis of survival of patients with gastric cancer of various clinical stages depending on EBER status.

чий (рис. 3, д, е) — минимальное *p*-значение логрангового критерия составило 0,5622.

Выживаемость пациентов с EBER-положительной опухолью IV стадии (13,0 мес) также была незначительно выше по сравнению с аналогичным показателем для пациентов с EBER-отрицательными опухолями — 12,0 мес (см. табл. 3). Анализ общей 5-летней выживаемости пациентов не выявил статистически значимых различий (рис. 3, ж, з) — минимальное *p*-значение логрангового критерия составило 0,8006.

Дополнительно был проведен многофакторный анализ выживаемости в регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса и установлено, что EBER-статус не является значимым прогностическим признаком (HR=1,0143; ДИ: 0,9897—1,0196). Это свидетельствует о том, что отдельно взятый EBER-статус не оказывает значимого влияния на прогноз у пациентов с раком желудка.

Заключение

Установлено, что EBER-положительные аденокарциномы желудка преимущественно являются опухолями промежуточного типа по классификации P. Lauren и опухолями high grade по Классификации ВОЗ 2019 г.

Не выявлены статистически значимые различия между пациентами с EBER-положительными и EBER-отри-

цательными опухолями как в общей выборке, так и по стадиям опухолевого процесса. Однако при этом пациенты с EBER-положительными опухолями III стадии характеризуются большими медианами выживаемости по сравнению с пациентами с EBER-отрицательными опухолями аналогичной стадии. Показано, что отдельно взятый EBER-статус не является значимым независимым прогностическим признаком и может рассматриваться только в совокупности с «классическими» клинико-морфологическими характеристиками, основная из которых — стадия опухолевого процесса, так как именно они в первую очередь определяют прогностические свойства опухоли.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №20-75-00037.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Н.В. Данилова, И.А. Михайлов, П.Г. Мальков

Сбор и обработка материала — Д.В. Калинин, А.В. Чайка, В.М. Хомяков, М.Ю. Юдин, В.В. Какоткин

Статистическая обработка данных — И.А. Михайлов, Д.В. Вычужанин

Написание текста — Н.В. Данилова, Н.А. Олейникова

Редактирование — Ю.Ю. Андреева, П.Г. Мальков

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Uozaki H, Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008;1(3):198-216.
- Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2011;207(9):529-537. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.07.004>
- Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol.* 2015; 46(4):1421-1434. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2856>
- Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci.* 2008;99(2):195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00674.x>
- Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology.* 2009;137(3):824-833. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.001>
- The Cancer Genome Atlas (TCGA). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 513(7517):202-209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Rodriguez MG, Roviello G, D'Angelo A, Lavacchi D, Roviello F, Polom K. MSI and EBV positive gastric cancer's subgroups and their link with novel immunotherapy. *J Clin Med.* 2020;9(5):1427. <https://doi.org/10.3390/jcm9051427>
- Camargo MC, Kim KM, Matsuo K, Torres J, Liao LM, Morgan DR, Michel A, Waterboer T, Zabaleta J, Dominguez RL, Yatabe Y, Kim S, Rocha-Guevara ER, Lissowska J, Pawlita M, Rabkin CS. Anti-Helicobacter pylori antibody profiles in Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative gastric cancer. *Helicobacter.* 2016;21(2):153-157. <https://doi.org/10.1111/hel.12249>
- Sun K, Jia K, Lv H, Wang SQ, Wu Y, Lei H, Chen X. EBV-positive gastric cancer: current knowledge and future perspectives. *Front Oncol.* 2020;10:583463. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.583463>
- Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES, Kim YS. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(3):354-365. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05775.x>
- Gasenko E, Isajevs S, Camargo MC, Offerhaus GJA, Polaka I, Gulley ML, Skapars R, Sivins A, Kojalo I, Kirsners A, Santare D, Pavlova J, Sjomina O, Liepina E, Tzivian L, Rabkin CS, Leja M. Clinicopathological characteristics of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer in Latvia. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2019;31(11):1328-1333. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001521>
- Gulley ML, Glaser SL, Craig FE, Borowitz M, Mann RB, Shema SJ, Ambinder RF. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(2):259-267. <https://doi.org/10.1309/MMAU-0QYH-7BHA-W8C2>
- Weiss LM, Chen YY. EBER in situ hybridization for Epstein-Barr virus. *Methods Mol Biol.* (Clifton, NJ). 2013;999:223-230. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-357-2_16
- Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington MK, Carneiro F, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2019 August. <https://doi.org/10.1111/his.13975>

Поступила 18.11.2021

Received 18.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Морфохимическое исследование альфа-синуклеина, железа и железосодержащих белков в черном веществе головного мозга при болезни Паркинсона

© В.Н. САЛЬКОВ, Р.М. ХУДОЕРКОВ, Д.Н. ВОРОНКОВ, В.Б. СОБОЛЕВ

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить, используя комплексный морфохимический подход, локализацию альфа-синуклеина, соединений железа и железосодержащих белков в структурах черного вещества головного мозга при болезни Паркинсона (БП).

Материал и методы. Методами гистохимии и иммуногистохимии исследовали локализацию патологического альфа-синуклеина (α -Syn-p129), соединений железа и железосодержащих белков — трансферринового рецептора и ферритина в нейронах и нейроглии в черном веществе мозга умерших больных БП и лиц с не выявленной при жизни неврологической симптоматики (контроль).

Результаты. В черном веществе мозга больных БП по сравнению с контролем обнаружили устойчивое накопление патологического альфа-синуклеина (α -Syn-p129) в телах и отростках нейронов, а в нейроглии и нейропиле — накопление железа (II) и тяжелой цепи ферритина, реакция микроглии на белок CD68 была умеренно повышена. Трансмембранный белок CD71 определялся в равной степени как в мозге больных БП, так и в контроле.

Заключение. Синаптический белок альфа-синуклеин при БП превращается в патологический метаболит, который накапливается в структурах substantia nigra и, вероятно, нарушает проведение нервного возбуждения. Избыточное накопление тяжелой цепи ферритина в нейроглии может повышать концентрацию реактивной формы железа и усиливать нейротоксичность. Равномерное распределение трансмембранного гликопротеина CD71 в структурах substantia nigra как в контроле, так и у больных БП свидетельствует о сохранности транспорта негемового железа при нейродегенеративном процессе.

Ключевые слова: мозг человека, черное вещество, болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, железо, трансферриновый рецептор, ферритин.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сальков В.Н. — <https://orcid.org/0000-0002-1580-0380>

Худоерков Р.М. — <https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>

Воронков Д.Н. — <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Соболев В.Б. — <https://orcid.org/0000-0002-7704-1092>

Автор, ответственный за переписку: Сальков В.Н. — e-mail: vla-salkov@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Сальков В.Н., Худоерков Р.М., Воронков Д.Н., Соболев В.Б. Морфохимическое исследование альфа-синуклеина, железа и железосодержащих белков в черном веществе головного мозга при болезни Паркинсона. *Архив патологии*. 2022;84(2):13–19. <https://doi.org/10.17116/patol20228402113>

Morphochemical study of alpha-synuclein, iron and iron-containing proteins in the substantia nigra of the brain in Parkinson's disease

© V.N. SALKOV, R.M. KHUDOERKOV, D.N. VORONKOV, V.B. SOBOLEV

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

ABSTRACT

Objective. To study, using a complex morphochemical approach, the localization of alpha-synuclein, iron compounds and iron-containing proteins in the structures of the substantia nigra of the brain in Parkinson's disease (PD).

Material and methods. Histochemistry and immunohistochemistry methods have been used to study the localization of pathological alpha-synuclein (α -Syn-p129), iron compounds and iron-containing proteins — transferrin receptor and ferritin in neurons and neuroglia in the substantia nigra of the brain of deceased PD patients and persons with no neurological symptoms detected during life (control).

Results. In the substantia nigra of PD patients, in comparison with the control, a stable accumulation of pathological alpha-synuclein (α -Syn-p129) in the bodies and processes of neurons was found, and in the neuroglia and neuropil — the accumulation of iron (II) and ferritin heavy chain, the reaction of microglia to protein CD68 was moderately elevated. The transmembrane protein CD71 was detected equally in the brains of PD patients and in controls.

Conclusion. Synaptic protein alpha-synuclein in PD turns into a pathological metabolite that accumulates in the structures of substantia nigra, and probably disrupts the conduction of nervous excitation. Excessive accumulation of the ferritin heavy chain in neuroglia can increase the concentration of reactive forms of iron and increase neurotoxicity. The uniform distribution

of the transmembrane glycoprotein CD71 in the of substantia nigra structures both in the control and in PD patients indicates the preservation of non-heme iron transport during the neurodegenerative process.

Keywords: human brain, substantia nigra, Parkinson's disease, alpha-synuclein, iron, transferrin receptor, ferritin.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Salkov V.N. — <https://orcid.org/0000-0002-1580-0380>

Khudoerko R.M. — <https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>

Voronkov D.N. — <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Sobolev V.B. — <https://orcid.org/0000-0002-7704-1092>

Corresponding author: Salkov V. N. — e-mail: vla-salkov@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Salkov VN, Khudoerko RM, Voronkov DN, Sobolev VB. Morphochemical study of alpha-synuclein, iron and iron-containing proteins in the substantia nigra of the brain in Parkinson's disease. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):13–19. (In Russ.).

<https://doi.org/10.17116/patol20228402113>

Болезнь Паркинсона (БП) рассматривается как одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, она встречается с частотой 1–2 случая на 1000 населения [1]. В основе патологического процесса при БП лежит протеинопатия, проявляющаяся на молекулярном уровне в нарушении агрегации белка альфа-синуклеина, который накапливается в структурах центральной и периферической нервной системы [2], и сочетающаяся с ферропатией — отложением железа и железосодержащих белков [3].

Альфа-синуклеин — это пресинаптический белок, он имеет простую структуру и участвует в процессах везикулярного транспорта [4]. Высокая концентрация этого белка при окислительном стрессе, инициирующем нейродегенерацию, может запускать каскад реакций, способствующих его аномальной внутриклеточной агрегации [5]. Агрегированный альфа-синуклеин подвергается фосфорилированию по остатку серина-129 (α -Syn-p129) и накапливается в нейронах нигростриатных образований головного мозга [6], в периферических вегетативных нейронах [7] и нервных волокнах [8]. Патологические включения α -Syn-p129 обнаруживают иммуногистохимическими методами в перечисленных выше структурах нервной системы в аутопсийном материале пациентов с БП [9].

Двухвалентное железо (II) при помощи рецепторов трансферрина поступает в нервные клетки из диферринового трансферрина (белка плазмы крови) [10]. В дофаминовых нейронах нигростриатной системы ионы железа (II) участвуют в синтезе дофамина из L-диоксифенилаланина, отдавая один электрон и образуя трехвалентное железо (III), которое, если оно не восстанавливается, может запускать реакцию Фентона, связанную с образованием окислительных свободных радикалов [11]. В нейронах трехвалентное железо связывает цитоплазматический пигмент нейромеланин, выполняющий роль хелатирующего агента [10]. В клетках нейроглии аналогичную роль по отношению к ионам железа (III) играет белок ферритин.

При БП железо накапливается в структурах компактной части черного вещества головного мозга, что было показано при использовании как методов гистохимии [12], так и метода рентгенологической абсорбционной спектроскопии [13], который позволил не только обнаружить соединения железа, связанные с нейромеланином, но и вычислить их количественные параметры. Вместе с тем в литературе нет единого представления об изменениях экспрессии ферритина при БП: по мнению одних авторов, она увели-

чивается [14], по мнению других — она не меняется [15]. При этом оценка изменений метаболизма железа и железосодержащих белков в нигростриатных структурах головного мозга при БП будет неполной без определения локализации и состояния рецепторных зон трансферриновых рецепторов в клетках. В то же время сведений о том, подвергаются ли морфологическим изменениям трансферриновые рецепторы клеточных структур черного вещества головного мозга при БП, в доступной литературе мы не нашли.

Цель работы — исследовать, используя комплексный морфохимический подход, локализацию альфа-синуклеина, соединений железа и железосодержащих белков в структурах черного вещества головного мозга при болезни Паркинсона.

Материал и методы

Аутопсийные образцы среднего мозга были взяты как у лиц со смешанной формой БП, которые умерли от интеркуррентных заболеваний (возраст 60, 61, 63 и 70 лет — 4 случая), так и у лиц контрольной группы, у которых при жизни не выявляли неврологической симптоматики (60–70 лет — 6 случаев). Образцы мозга фиксировали в 4% растворе формалина, подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в парафиновые блоки, которые раскладывали на серии фронтальных срезов толщиной 10 мкм в границах структур, соответствующих компактной части черного вещества головного мозга. На одной части срезов гистохимическим методом выявляли соединения железа (II), на другой иммуногистохимическими методами — железосодержащие белки и альфа-синуклеин. Соединения железа (II) определяли методом Перлса при помощи 2% раствора гексацианоферрата (II) калия и 2% раствора соляной кислоты, предварительно обрабатывая срезы 30% раствором перекиси водорода в течение 30 мин. Патологическую форму фосфорилированного альфа-синуклеина (α -Syn-p129) в структурах черного вещества выявляли, используя иммуноферментный и иммунофлюоресцентный методы. При проведении первого метода применяли первичные антитела к α -Syn-p129 (фирма Abcam, №ab184674), а в качестве хромогена — вторичные антитела из набора Sigma EXTRA-3 и 3,3-диаминобензидин. При выполнении второго метода также использовали первичные антитела к α -Syn-p129 (фирма Abcam, №ab184674), а иммунофлюоресцентное окрашивание проводили вторичными антителами козы к иммуноглобулинам

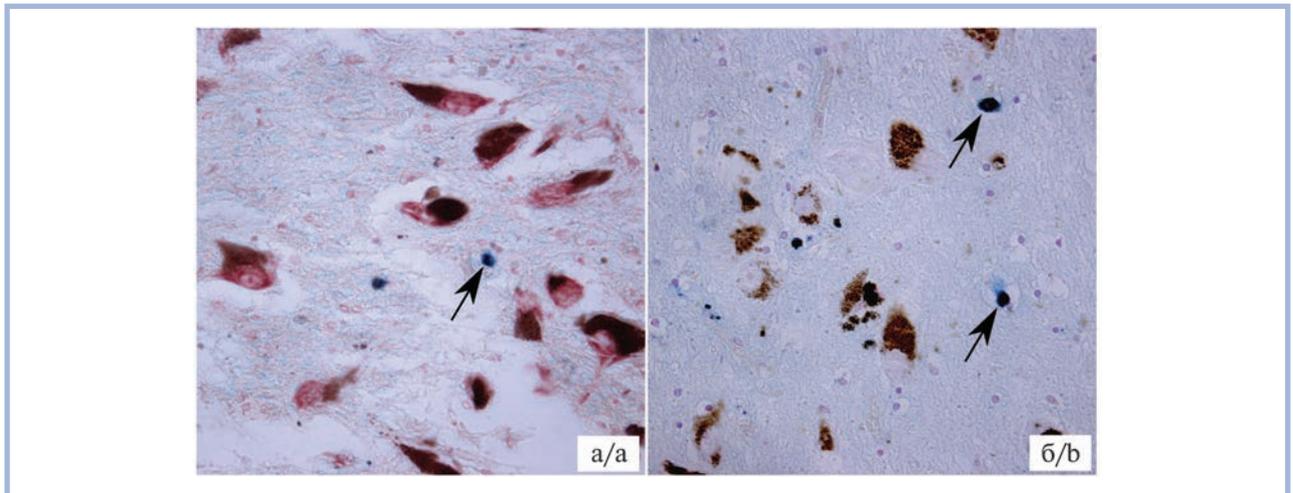


Рис. 1. Соединения железа в компактной части черного вещества мозга лиц контрольной группы (а) и пациентов с болезнью Паркинсона (б).

Стрелками показаны клетки нейроглии, содержащие соединения железа. Реакция Перлса, докрасивание красным прочным, $\times 400$.

Fig. 1. Iron deposits in the substantia nigra pars compacta of the human brain of the control group (a) and patients with Parkinson's disease (b).

Arrows indicate neuroglial cells containing iron. Perls reaction, counterstaining with Nuclear Fast Red. $\times 400$.

кролика, которые были конъюгированы с флюорохромом CF488 (фирма Sigma). Иммунофлюоресцентным методом выявляли и трансферриновый рецептор, используя первичные антитела к трансмембранному гликопротеину CD71 (фирма Abcam, №ab84036), а соответствующее окрашивание проводили вторичными антителами осли к иммуноглобулинам мыши, которые были конъюгированы с флюорохромом CF555 (фирма Sigma). В глиальных клетках (астроглии, олигодендроглии и микроглии) ферритин выявляли иммуноферментным методом с двойной меткой, применяя кроличьи антитела к тяжелой цепи ферритина (фирма Abcam, №ab75972). Идентифицировали астроглию с помощью реакции на GFAP, используя мышинные антитела (фирма Leica, №PA0026), олигодендроглию — реакции на циклонуклеотидфосфатазу (CNP) с применением мышинных антител к этому ферменту (фирма Sigma, №AMAb91068), а микроглию — реакции на белок CD68 также с помощью мышинных антител к этому белку (фирма Abcam, №ab201340). Иммуноферментные реакции проводили на гистостейнере Leica BOND MAX (фирма Leica), используя набор двойной детекции ChromoPlex-1 (фирма Leica, №DS9477). Локализацию α -Syn-p129, железа и железосодержащих белков в структурах черного вещества оценивали под микроскопом Leica DMLB, оснащенный цифровой фотокамерой с программой анализа изображений Leica Qwin. Микрофотографии иммунофлюоресцентных препаратов получали на микроскопе Nikon Ni-E, используя монохромную камеру Nikon Ds-Qi.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что соединения железа (II), выявляемые гистохимическим методом, локализовались в структурах компактной части черного вещества как в контрольной группе, так и у больных БП (рис. 1, а, б). В группе контроля соединения железа (II) располагались относительно равномерно в нейропиле, однако их обнаруживали и вокруг стенок сосудов, и в единичных клет-

ках нейроглии (см. рис. 1, а). По сравнению с контролем у больных БП исследуемые соединения в нейропиле окрашивались интенсивнее, но неравномерно, для клеточных элементов было характерно их наличие в нейроглии, в нейронах они определялись в единичных клетках (см. рис. 1, б).

Иммуноферментным методом патологическую форму альфа-синуклеина α -Syn-p129 не обнаруживали в контроле, но выявляли во всех исследованных случаях БП (рис. 2, а, б). Агрегаты α -Syn-p129 располагались в виде скоплений белка в нейритах (см. рис. 2, а), а также в виде телец Леви, локализовавшихся как в цитоплазме нейронов, так и вне клеток (см. рис. 2, б). Иммунофлюоресцентным методом фосфорилированный альфа-синуклеин в структурах черного вещества обнаружили только в 1 случае из 6 образцов контрольной группы (рис. 3, а), а в аутопсийных образцах больных БП его определяли во всех исследованных случаях. Эта патологическая форма альфа-синуклеина в виде агрегатов белка выявлялась в телах нейронов и их отростках, а также в окружающем нейропиле (рис. 3, б). Иммуноокрашивание на трансферриновый рецептор характеризовалось равномерной мембранной реакцией на гликопротеин CD71 в клетках черного вещества лиц контрольной группы и пациентов с БП (см. рис. 3, а, б).

Определение типа глиальных клеток, в которых локализовался ферритин, показало, что во всех изученных случаях и в контрольной группе, и у лиц с БП он располагался в нейропиле вокруг клеток астроглии, содержащей GFAP (т.е. был солокализован с продуктом GFAP-реакции и изображения накладывались), и в клетках микроглии (рис. 4, 5). При оценке реакции на белок активированной микроглии выявлялся в единичных клетках микроглии (см. рис. 5, а), а у лиц с БП он определялся во множестве микроглиальных клеток (см. рис. 5, б). Проведение иммуногистохимических реакций на выявление ферритина и глиоспецифических белков в структурах черного вещества головного мозга не позволило обнаружить ферритин в клетках олигодендроглии, но помогло выявить его в нейронах

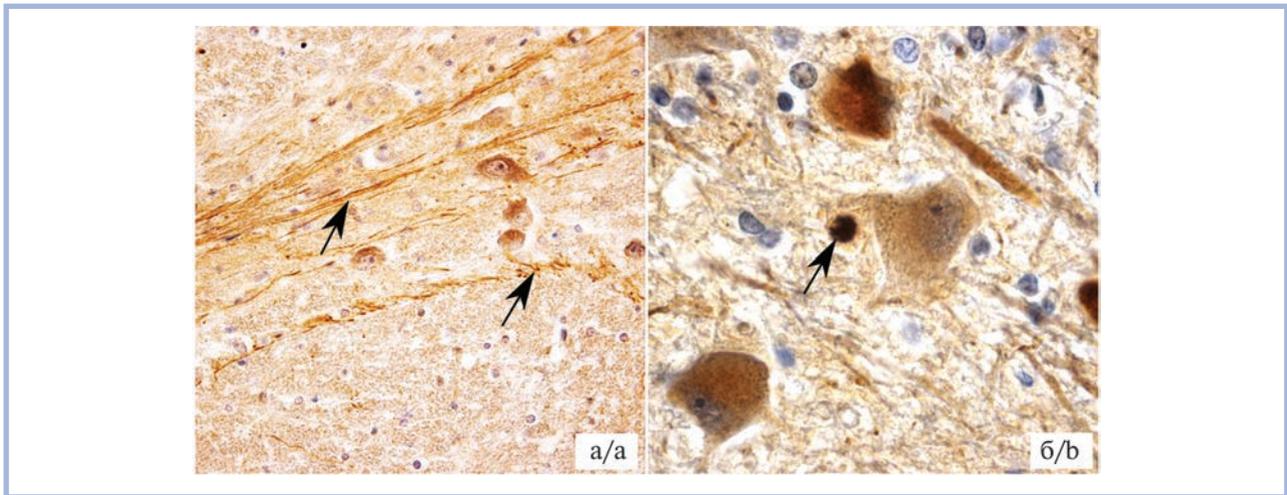


Рис. 2. Патологические белковые агрегаты в черном веществе мозга человека при болезни Паркинсона.
 а — синуклеинпозитивные включения в нервных волокнах (стрелки), $\times 400$; б — тельце Леви (стрелка), локализованное вне пигментированного нейрона, $\times 1000$. Иммуногистохимическая реакция на α -Syn-p129, докрасивание крезильовым фиолетовым.

Fig. 2. Pathological protein aggregates in the substantia nigra of the human brain in Parkinson's disease.
 а — synuclein-positive inclusions in nerve fibers (arrows), $\times 400$; б — Lewy body (arrow), localized outside the pigmented neuron, $\times 1000$. Immunohistochemical reaction for α -Syn-p129, counterstaining with Cresyl Violet.

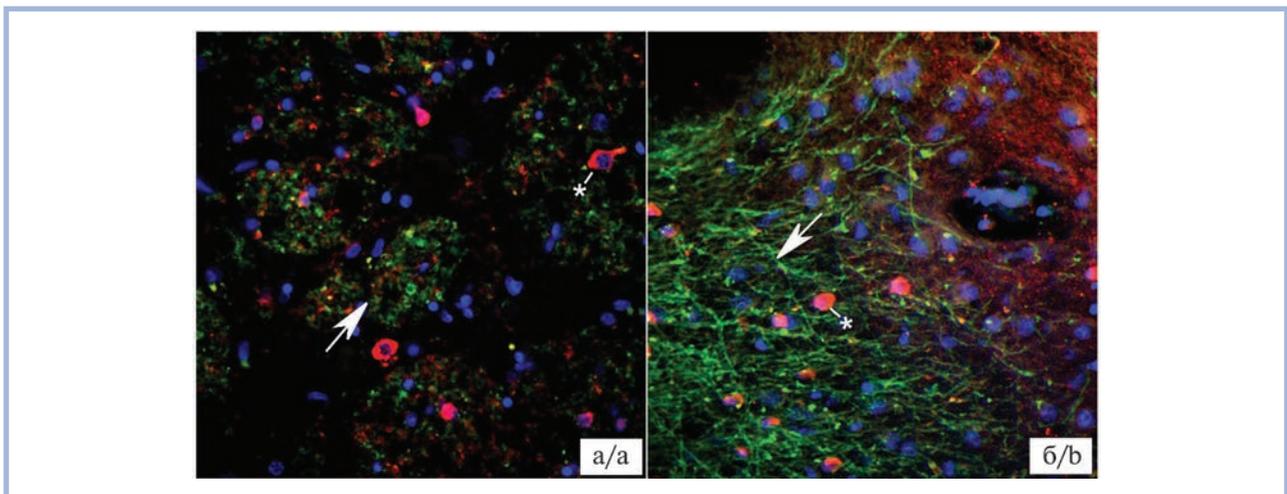


Рис. 3. Патологические белковые агрегаты и белок рецепторов трансферрина (CD71) в черном веществе мозга лиц контрольной группы (а) и пациентов с болезнью Паркинсона (б).

Стрелки — локализация синуклеинпозитивных включений в отростках нейронов, звездочки — локализация белка CD71 вдоль поверхности тел нейронов. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на α -Syn-p129 (зеленым) и белок рецепторов трансферрина CD71 (красным), $\times 400$.

Fig. 3. Pathological protein aggregates and transferrin receptor protein (CD 71) in the substantia nigra of the control group (a) and patients with Parkinson's disease (b).

Synuclein-positive inclusions in the processes of neurons (arrows), CD 71 protein on the surface of neuronal bodies (asterisks). Double immunofluorescent staining for α -synuclein, α -Syn-p129 (green) and transferrin receptor protein, CD71 (red), $\times 400$.

как контрольной группы (см. рис. 5, а), так и лиц с БП (см. рис. 4, б; 5, б).

Проведенное исследование помогло обнаружить соединения железа (II) и тяжелую цепь ферритина в клетках нейроглии и нейропиле компактной части черного вещества в контрольной группе и у больных БП, но при БП интенсивность реакции при выявлении железа была выше, и исследуемые соединения определялись во многих клетках нейроглии. По данным литературы, соединения железа

при физиологическом старении накапливаются как в нейронах, так и в нейроглии [16], но при БП их концентрация в структурах черного вещества по сравнению с физиологическим старением увеличивается в 2 раза [17]. Следовательно, сопоставляя наши результаты с данными литературы, можно предположить, что при БП железо может избыточно накапливаться как в нейронах, так и нейроглии черного вещества головного мозга. На это указывает и тот факт, что в нашем исследовании у больных БП

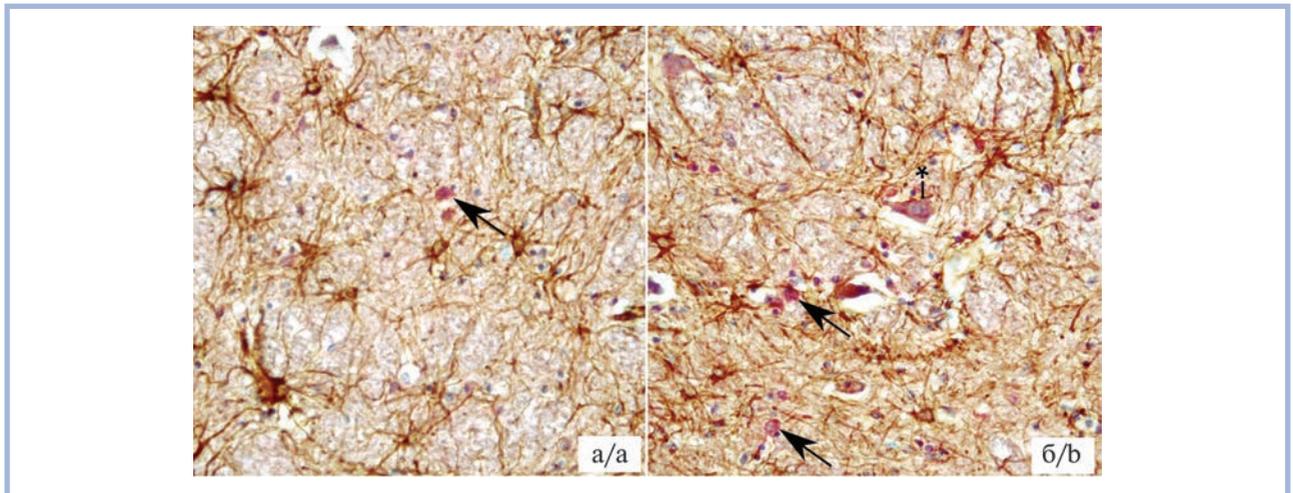


Рис. 4. Ферритин в клетках ретикулярной части черного вещества головного мозга лиц контрольной группы (а) и пациентов с болезнью Паркинсона (б).

Локализация ферритина в микроглии (стрелки), в цитоплазме нейрона (звездочка). Двойное иммуногистохимическое окрашивание на GFAP-позитивную астроглию (коричневым) и ферритин (красным), докрасивание гематоксилином, $\times 400$.

Fig. 4. Ferritin in the cells of the substantia nigra pars reticulata of the control group (a) and patients with Parkinson's disease (b).

Ferritin in microglia (arrows) and in the cytoplasm of the neuron (asterisk). Double immunohistochemical staining for GFAP-positive astroglia (brown) and ferritin (red), counterstaining with hematoxylin, $\times 400$.

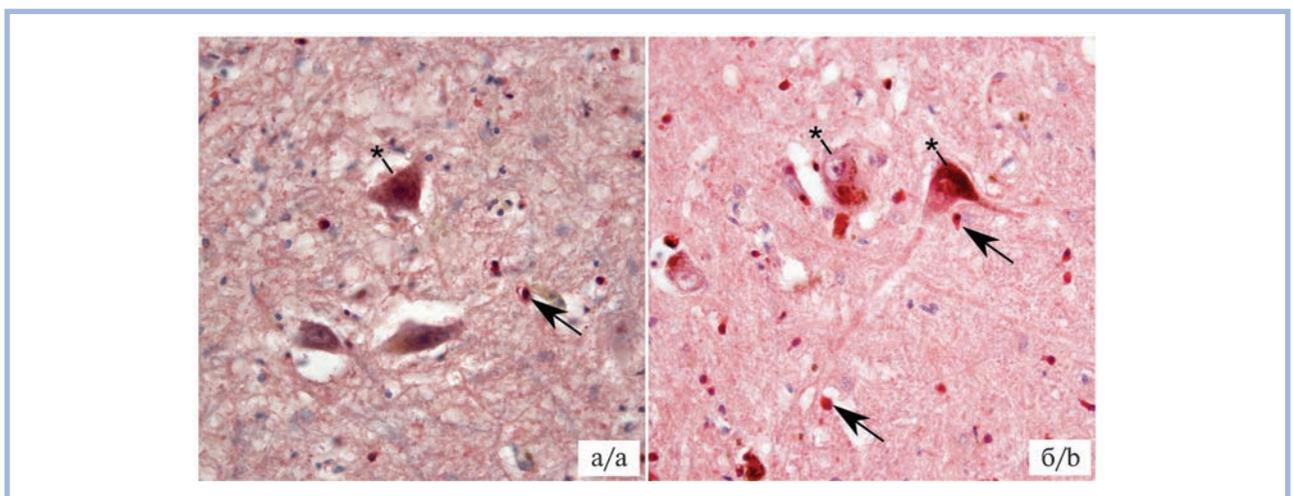


Рис. 5. Ферритин в клетках компактной части черного вещества головного мозга лиц контрольной группы (а) и пациентов с болезнью Паркинсона (б).

Ферритин в микроглии (стрелки), в цитоплазме нейронов (звездочки). Двойное иммуногистохимическое окрашивание на белок микроглии CD68 (коричневым) и ферритин (красным), докрасивание гематоксилином, $\times 400$.

Fig. 5. Ferritin in the cells of the substantia nigra pars compacta of the control group (a) and patients with Parkinson's disease (b).

Ferritin localization in microglia (arrows) and in the cytoplasm of neurons (asterisks). Double immunohistochemical staining for microglial protein CD68 (brown) and ferritin (red), counterstaining with hematoxylin, $\times 400$.

по сравнению с контролем метаболиты, содержащие тяжелую цепь ферритина — белка, связывающего ионы железа, — в значительном количестве локализовались в клетках нейроглии компактной части черного вещества. Если принять во внимание, что при БП происходит избыточная экспрессия тяжелой цепи ферритина, которая катализирует быстрое окисление железа (II) до трехвалентной формы (III) [18], и при этом железо (III) не восстанавли-

вается, то эта ситуация будет усиливать окислительный стресс и усугублять нейродегенерацию. В литературе показана роль железа в регуляции экспрессии эндогенного альфа-синуклеина [19] и установлено, что его фосфорилированная форма накапливается у больных БП в телах и отростках нейронов компактной части черного вещества головного мозга [20]. Результаты нашего гистохимического и иммуногистохимического исследования структур

головного мозга при БП — интенсивная реакция на железо в клеточных элементах и нейропиле, выявление скоплений α -Syn-p129 в телах и отростках нейронов и окружающем их нейропиле — не дают достаточных оснований для оценки роли соединений железа в увеличении экспрессии фосфорилированного альфа-синуклеина. Однако они позволяют установить, что указанные метаболиты (соединения железа и α -Syn-p129) накапливаются в структурах компактной части черного вещества головного мозга при нейродегенерации, а обнаруженные изменения при БП устойчивы и необратимы, что хорошо согласуется с данными литературы [21]. Кроме того, удалось показать, что в единичных случаях α -Syn-p129 может концентрироваться в нигростриатных структурах головного мозга и у лиц пожилого возраста без неврологических симптомов при жизни, что также соотносится с источниками литературы [4]. Вместе с тем такое накопление может указывать и на развитие ранней стадии БП, характеризующейся отсутствием отчетливой клинической симптоматики со стороны центральной нервной системы.

Результаты, полученные при изучении локализации и экспрессии гликопротеина CD71 (трансферринового рецептора) в клеточных структурах черного вещества головного мозга, свидетельствуют о том, что его локализация и экспрессия в указанных структурах при БП по сравнению с контролем не изменяются. В связи с этим можно предположить, что при БП по сравнению с физиологическим старением транспорт железа в клетках компактной части черного вещества не затрудняется и даже не блокируется на поздних стадиях заболевания. Так как по мере развития БП железо продолжает поступать в клетки и его содержание по сравнению с физиологическим старением увеличивается, то это может перенасыщать сайты хелатирования нейромеланина в пигментированных нейронах [22] и способствовать гибели этих нейронов. Железо из гибнущих нейронов будет накапливаться в ферритинпозитивной микроглии [23], однако превышение буферной способности ферритина микроглиальных клеток, как и нейромеланина пигментированных нейронов, может усиливать нейротоксичность [24].

Заклучение

Сравнительное гистохимическое и иммуногистохимическое исследование структур компактной части черного вещества головного мозга человека, проведенное на аутопсийном материале пациентов с БП и лиц с не выявленной при жизни неврологической симптоматикой (контрольная группа), позволило обнаружить:

— устойчивое накопление в мозге пациентов с БП патологической формы фосфорилированного альфа-синуклеина (α -Syn-p129), который локализовался в телах и отростках пигментированных нейронов и окружающем их нейропиле;

— устойчивое накопление в мозге пациентов с БП соединений железа (II), которые локализовались преимущественно в нейроглии и нейропиле, а в нейронах они определялись лишь в единичных клетках;

— избыточное накопление в мозге пациентов с БП тяжелой цепи ферритина, которая обнаруживалась в клетках нейроглии, что может способствовать повышению концентрации реактивной формы железа в структурах черного вещества и приводить к усилению нейротоксичности;

— равномерную мембранную реакцию клеточных структур черного вещества на гликопротеин CD71 как в контроле, так и у пациентов с БП, свидетельствующую о сохранности транспорта железа в эти структуры при БП.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — В.Н. Сальков, Р.М. Худоерков

Сбор и обработка материала — В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков, В.Б. Соболев

Подготовка рисунков — Д.Н. Воронков

Написание текста — В.Н. Сальков, Р.М. Худоерков

Редактирование — Р.М. Худоерков

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(8):901-905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
2. 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):807-816. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.004>
3. Dusek P, Roos PM, Litwin T, Schneider SA, Flaten TP, Aaseth J. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;31:193-203. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.05.007>
4. Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo CM, Aguayo LG. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Front Neurosci*. 2015;(9):59. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00059>
5. Walker DG, Lue LF, Adler CH, Shill H, Caviness J, Sabbagh M, Akiyama H, Serrano G, Sue L, Beach T. Changes in properties of serine 129 phosphorylated α -synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Exp Neurol*. 2013;240:190-204. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.020>
6. Jellinger KA. Lewy body-related α -synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004;111(10-11):1219-1235. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0138-7>
7. Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: Evaluation and changes of concepts. *Mov Disord*. 2011;27(1):8-30. <https://doi.org/10.1002/mds.23795>
8. Cersosimo MG, Perandones C, Micheli FE, Raina GB, Beron AM, Nasswetter G, Radrizzani M, Benarroch EE. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies in Parkinson's disease patients. *Mov Disord*. 2011;26(1):188-190. <https://doi.org/10.1002/mds.23344>
9. Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8). Accessed October 12, 2021. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>
10. Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallo-rini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Hornykiewicz O, Zucca FA. 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):9843-9848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403495101>

11. Carboni E, Lingor P. Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Metallo-mics*. 2015;7:395-404. <https://doi.org/10.1039/c4mt00339j>
12. Reinert A, Morawski M, Seeger J, Arendt T, Reinert T. Iron concentrations in neurons and glial cells with estimates on ferritin concentrations. *BMC Neurosci*. 2019;20(1):25. Accessed October 12, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0507-7>
13. Morawski M, Meinecke C, Reinert T, Dorffel AC, Riederer P, Arendt T, Butz T. Determination of trace elements in the human substantia nigra. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B*. 2005;231:224-228. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.01.061>
14. Jellinger KA, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1990;2(4):327-340. <https://doi.org/10.1007/BF02252926>
15. Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hunot S, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2002;83(2):320-330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01118.x>
16. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Григорьев И.П. Распределение железа в структурах черного вещества головного мозга человека. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 2013;113(6):77-80. Ссылка активна на 12.10.21. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Grigor'ev IP. The distribution of iron in the substantia nigra in the human brain. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry=Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2013;113(6):77-80. (In Russ.). Accessed October 12, 2021. <https://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikiatrii-im-s-s-korsakova/2013/6/031997-72982013614>
17. Genoud S, Roberts BR, Gunn AP, Halliday GM, Lewis SJG, Ball HJ, Hare DJ, Double KL. Subcellular compartmentalisation of copper, iron, manganese, and zinc in the Parkinson's disease brain. *Metallo-mics*. 2017;9(10):1447-1455. <https://doi.org/10.1039/c7mt00244k>
18. Li K, Reichman H. Role of iron in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm*. 2016;123(4):389-399. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1508-7>
19. Madhavi T. Inflammation in Parkinson's disease: scientific and clinical aspects. Springer; 2014. Accessed October 12, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08046-8>
20. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011;5(4):46-51. Ссылка активна на 12.10.21. Pchelina SN. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology=Annaly Klinicheskoy I Experimental'noy Nevrologii*. 2011;5(4):46-51. (In Russ.). Accessed October 12, 2021. <https://annaly-nevrologii.com/wp-content/uploads/2016/09/Stranitsy-iz-Tom-5-4-2011-9.pdf>
21. Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. 2013;136(8):2419-2431. <https://doi.org/10.1093/brain/awt192>
22. 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;5:35-44. <https://doi.org/10.1007/bf03033371>
23. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*. 2014;13(10):1045-1060. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70117-6)
24. Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2003;86(5):1142-1148. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01923.x>

Поступила 10.11.2021

Received 10.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Влияние факторов роста тромбоцитов на сперматогенез после облучения электронами

© Г.А. ДЕМЯШКИН^{1, 2}, Т.Г. БОРОВАЯ³, Ю.Ю. АНДРЕЕВА⁴, С.Н. КОРЯКИН², М.А. ВАДЮХИН¹, В.И. ШЕКИН^{1, 2}

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия;

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

С каждым годом неуклонно растет количество случаев мужского бесплодия, в связи с чем необходима разработка новых методов диагностики и лечения этого заболевания. Известно, что высокой регенеративной активностью обладает плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP), α -гранулы которых содержат факторы роста, поэтому мы вправе ожидать позитивных результатов от ее применения для восстановления сперматогенного эпителия.

Цель исследования. Морфологическая оценка сперматогенеза после локального β -облучения в дозе 8 Гр и введения факторов роста.

Материал и методы. Крысы породы вистар ($n=135$) были поделены на пять групп: 1-я — контроль, 2-я — 8IR, 3-я — 8IR+LP-PRP+IGF, 4-я — 8IR+LP-PRP и 5-я — LP-PRP. Сперматогенез у животных 2, 3 и 4-й групп ингибировали однократным локальным облучением электронами в дозе 8 Гр. Затем на протяжении 11 нед крысам 3-й и 4-й групп внутрибрюшинно вводили LP-PRP, а крысам 3-й группы — дополнительно IGF-1. Семенники животных изучали методом световой микроскопии, компьютерной морфометрии, микро-КТ и вестерн-блоттинга.

Результаты. После облучения наблюдали снижение высоты сперматогенного эпителия и количества половых клеток вплоть до суб- и тотальной герминальной аплазии, фиброзирование и увеличение экспрессии каспазы-3. На фоне введения LP-PRP+IGF-1 снижение доли половых клеток (гипосперматогенез) было менее выражено.

Заключение. Введение факторов роста и других биологически активных веществ, высвобождаемых из α -гранул тромбоцитов LP-PRP, приводит к замедленному снижению количественно-качественных показателей сперматогенеза, а дополнительное введение IGF-1 усиливает регенеративные процессы, противодействующие развитию эффектов облучения электронами в дозе 8 Гр.

Ключевые слова: сперматогенез, облучение, гипосперматогенез, PRP, факторы роста.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Демяшкин Г.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Боровая Т.Г. — <https://orcid.org/0000-0001-8444-1801>

Андреева Ю.Ю. — <https://orcid.org/0000-0003-4749-6608>

Корякин С.Н. — <https://orcid.org/0000-0003-0128-4538>

Вадюхин М.А. — <https://orcid.org/0000-0002-6235-1020>

Шекин В.И. — <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Автор, ответственный за переписку: Демяшкин Г.А. — e-mail: dr.dga@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Демяшкин Г.А., Боровая Т.Г., Андреева Ю.Ю., Корякин С.Н., Вадюхин М.А., Шекин В.И. Влияние факторов роста тромбоцитов на сперматогенез после облучения электронами. *Архив патологии*. 2022;84(2):20–28. <https://doi.org/10.17116/patol20228402120>

Influence of platelets growth factors on spermatogenesis after electronic irradiation

© G.A. DEMYASHKIN^{1, 2}, T.G. BOROVAYA³, YU.Yu. ANDREEVA⁴, S.N. KORYAKIN², M.A. VADYUKHIN¹, V.I. SHEKIN^{1, 2}

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia;

³N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

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

ABSTRACT

Background. The number of cases of male infertility is steadily growing every year, and therefore it is necessary to develop new methods for the diagnosis and treatment of this disease. It is known that plasma enriched with platelets, the α -granules of which contain growth factors, possesses high regenerative activity; therefore, we can expect positive results from its use for the restoration of spermatogenic epithelium.

Objective. Morphological assessment of spermatogenesis after local β -irradiation with a dose of 8 Gy and the introduction of growth factors.

Material and methods. Wistar rats ($n=135$) were divided into groups: I — Control, II — 8IR, III — 8IR+LP-PRP+IGF, IV — 8IR+LP-PRP, and V — LP-PRP. Spermatogenesis in animals of groups II, III, and IV was inhibited by a single local irradiation with 8 Gy electrons. Then, for 11 weeks, LP-PRP was injected intraperitoneally to rats III and IV, and in group III — additionally IGF-1. The testes were examined by light microscopy, computer morphometry, micro-CT, and Western blotting.

Results. After irradiation, a decrease in spermatogenic epithelium and the number of germ cells was observed up to sub- and total germinal aplasia, fibrosis and an increase in the expression of caspase-3. Against the background of LP-PRP+IGF administration, the decrease in the proportion of germ cells (hypospermatogenesis) was less pronounced.

Conclusion. The introduction of growth factors and other biologically active substances released from the α -granules of LP-PRP platelets leads to a delayed decrease in the quantitative and qualitative indicators of spermatogenesis, and the additional administration of IGF-1 enhances the regenerative processes that counteract the development of the effects of electron irradiation with a dose of 8 Gy.

Keywords: spermatogenesis, radiation, hypospermatogenesis, PRP, growth factors.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Demyashkin G.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Borovaya T.G. — <https://orcid.org/0000-0001-8444-1801>

Andreeva Yu.Yu. — <https://orcid.org/0000-0003-4749-6608>

Koryakin S.N. — <https://orcid.org/0000-0003-0128-4538>

Vadyukhin M.A. — <https://orcid.org/0000-0002-6235-1020>

Shekin V.I. — <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Corresponding author: Demyashkin G.A. — e-mail: dr.dga@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Demyashkin GA, Borovaya TG, Andreeva YuYu, Koryakin SN, Vadyukhin MA, Shekin VI. Influence of platelets growth factors on spermatogenesis after electronic irradiation. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):20–28. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402120>

С каждым годом неуклонно растет количество случаев мужского бесплодия [1], в том числе среди лиц, получавших сеансы химио- и радиотерапии вследствие онкологической патологии [2, 3].

Ионизирующее излучение прямо и косвенно активирует генерацию активных форм кислорода и азота, приводит к хромосомным aberrациям [4], вызывает разрушение зрелых половых клеток и нарушение процессов деления и созревания новых клеточных поколений. Токсические эффекты облучения наиболее выражены по отношению к активно пролиферирующим клеткам и, вероятно, по этой причине семенник с присущей ему практически перманентной митогенной активностью сперматогоний оказывается одним из наиболее радиочувствительных органов [5].

Изучение механизмов инфертильности и оценка эффективности ее терапии требуют создания экспериментальных моделей с возможностью экстраполяции результатов на человека. В отличие от распространенных моделей гипосперматогенеза (способ введения цитостатиков и цитотоксических препаратов) облучение позволяет добиться как обратимых, так и необратимых эффектов на сперматогенез путем варьирования доз, локального облучения гонад или облучения всего тела животных [5].

Известно, что многие факторы роста, высокие концентрации которых содержатся в α -гранулах тромбоцитов, обладают выраженной способностью активировать регенерацию, поддерживая жизнедеятельность клеток и тканей [6] и оказывая позитивное влияние на их реабилитацию после разного рода повреждений [7–9]. Так, трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) стимулирует пролиферацию фибробластов, синтез молекул коллагена I типа и фибронектина [7]. Эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) активируют ангиогенез, фактор роста тромбоцитов (PDGF) участвует в регуляции ауто- и паракринных механизмов регуляции. Также получены доказательства митогенной активности у инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и его позитивного влияния на процессы спермато- и стероидогенеза [7, 10–13].

Плазма, обогащенная тромбоцитами (*англ.* Platelet rich plasma — PRP), содержит большое количество факторов ро-

ста и широко используется в современной регенеративной медицине [14, 15]. Перспективным для репродуктологии является способность PRP ускорять восстановление овофолликулогенеза, что показано в экспериментах на инфертильных самках крыс [16]. В вопросах влияния PRP на развитие мужских половых клеток состоянии их микроокружения и гематотестикалярный барьер отмечается существенный дефицит информации.

Цель исследования — морфологическая оценка сперматогенеза после локального β -облучения в дозе 8 Гр и его возможная реабилитация при помощи введения факторов роста.

Материалы и методы

Животные для исследования in vivo. В качестве модели использовали самцов половозрелых крыс линии Wistar (220 ± 20 г; возраст 9–10 нед; $n=135$). Животных содержали в виварии при 12-часовом световом дне, проводили кондиционирование при температуре 23 °С и влажности 40–60%, использовали стандартный рацион питания с водой *ad libitum*. При этом соблюдали все асептические меры предосторожности. Все манипуляции осуществляли согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ЕЭС, Страсбург, 1986) и Руководству по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), исследования были также одобрены локальным этическим комитетом.

Дизайн эксперимента. Экспериментальные животные ($n=135$) были случайным образом поделены на пять групп (условные названия): 1-я — контроль, 2-я — 8IR, 3-я — 8IR+LP-PRP+IGF, 4-я — 8IR+LP-PRP и 5-я — LP-PRP (*рис. 1*).

Выведение животных из эксперимента. Животных всех 5 групп выводили из эксперимента путем введения высо-

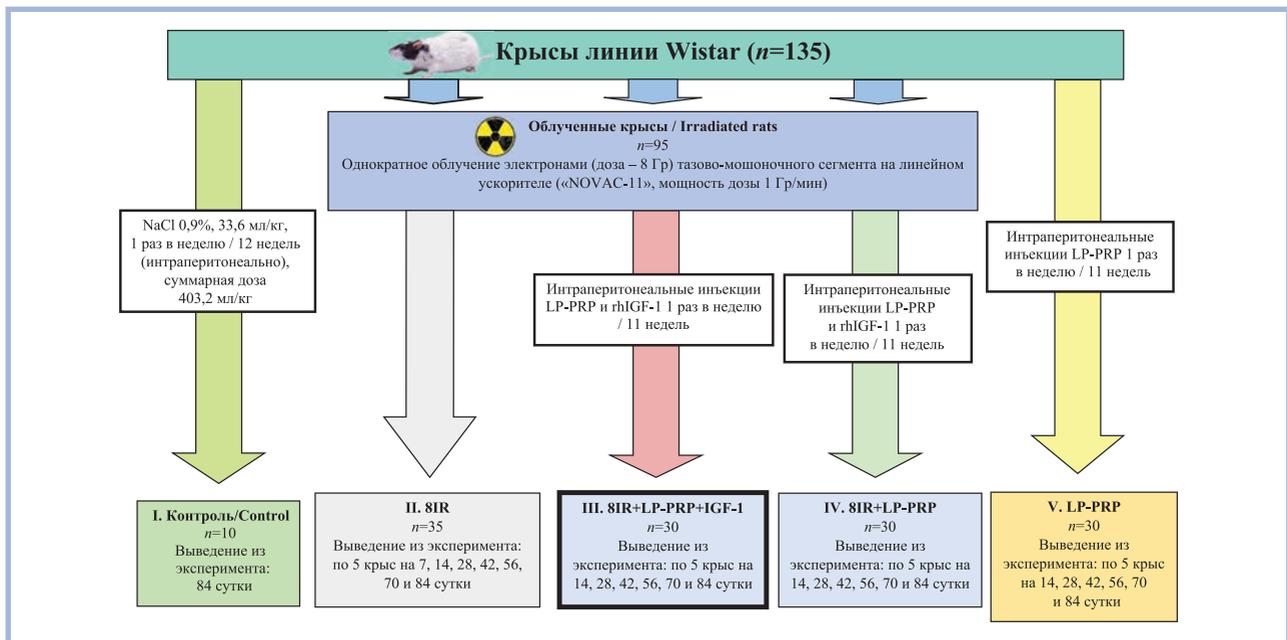


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Fig. 1. Experiment design.

ких доз анестетика (кетамин в дозе 50 мг/кг внутримышечно и ксилазин в дозе 5 мг/кг интраперитонеально) согласно дизайну (см. рис. 1).

Ионизирующее излучение (IR). Животных подвергали прицельному облучению тазового сегмента в дозе 8 Гр (мощность дозы 1 Гр/мин, энергия 10 МэВ и частота 9 Гц, размер поля — Ø (диаметр тубуса) 100 мм) с использованием линейного акселератора (NOVAC-11, радиологическое отделение экспериментального корпуса МРНЦ им. А.Ф. Цыба, Обнинск, Россия). Данная установка позволяет получить пучок электронов с энергией 4, 6, 8, 10 МэВ; пучок возможно отколлимировать до Ø 30—100 мм с шагом 10 мм; частоту бенчей в пучке можно регулировать от 1 до 24 Гц с шагом 1 Гц. Мощность дозы была откалибрована с помощью физической дозиметрии группой радиационной безопасности в рамках требований стандартной калибровки в соответствии с рекомендациями Агентства по ядерной энергии (NEA) России. Перед облучением крыс 2—4-й групп анестезировали однократным введением кетамина (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазина (5 мг/кг, внутривенно). Анестезированных животных помещали на предметный стол по одной крысе в положении лежа на спине с расставленными в стороны лапами таким образом, чтобы в зону облучения попадали семенники, а легкие и сердце оставались в зоне радиационной тени. Тубус подводили к облучаемой области так, чтобы его срез находился не выше 2 мм от кожи, а сам тубус был перпендикулярен плоскости кожи.

Приготовление плазмы, обогащенной тромбоцитами и бедной лейкоцитами (LP-PRP). Кровь (2 мл) забирали из периферической вены хвоста и смешивали с антикоагулянтом из расчета на 2 мл крови 0,2 мл 5% раствора цитрата натрия. LP-PRP получали, используя двухступенчатое центрифугирование цитратной крови при комнатной температуре (20—24 °С): на первой ступени скорость 1800 об/мин ($\approx 543,35$ г) в течение 10 мин. Образовавшийся надсадочный слой жидкости в объеме 1 мл отбирали с помощью шприца и перенесли в чистую сухую пробирку; на второй ступени проводили

центрифугирование со скоростью 3400 об/мин ($\approx 1938,61$ г) в течение 10 мин. Надсадочный слой удаляли, а оставшийся на дне тромбоцитарный слой (0,2 мл) активировали хлоридом кальция (около 0,05 мл 10% CaCl_2). Для анализа количества тромбоцитов крови была использована система XT-1600i. Количество тромбоцитов LP-PRP (1 900 000 тромбоцитов в 1 мкл) было примерно в 3 раза больше, чем уровень тромбоцитов крови (61 000 тромбоцитов в 1 мкл). LP-PRP вводили сразу после приготовления.

Инсулиноподобный фактор роста-1 (Insulin-like growth factor-1). Рекомбинантный IGF-1 (rhIGF-1, Sigma Aldrich, США; 2 мг/кг) вводили животным 3-й группы 1 раз в неделю в течение 11 нед.

Измерение уровня гормонов (фолликулостимулирующего гормона (FSH), лютеинизирующего гормона (LH) и общего тестостерона) проводили с помощью sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) согласно протоколам производителя (E0182Ra, E0179Ra, E0259Ra BT-Labs, Китай) с использованием считывателей микропланшетов (BioTek Epoch, Winooski, VT).

Морфологическое исследование

После извлечения семенники взвешивали (масса абсолютная (в г) и относительная по отношению к массе тела (в %)), рассчитывали их объем, замеряли, оценивали внешний вид, состояние паренхимы на разрезе. Затем нарезали параллельно сагитальной плоскости каждые 2 мм, фиксировали в растворе Буэна, после проводки (аппарат гистологической проводки тканей Leica Biosystems, Германия) заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные срезы (толщиной 3 мкм), депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином для гистологического исследования.

Микроскопический анализ выполняли с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD; компьютер Platrun LG), а морфометрические данные получали с использовани-

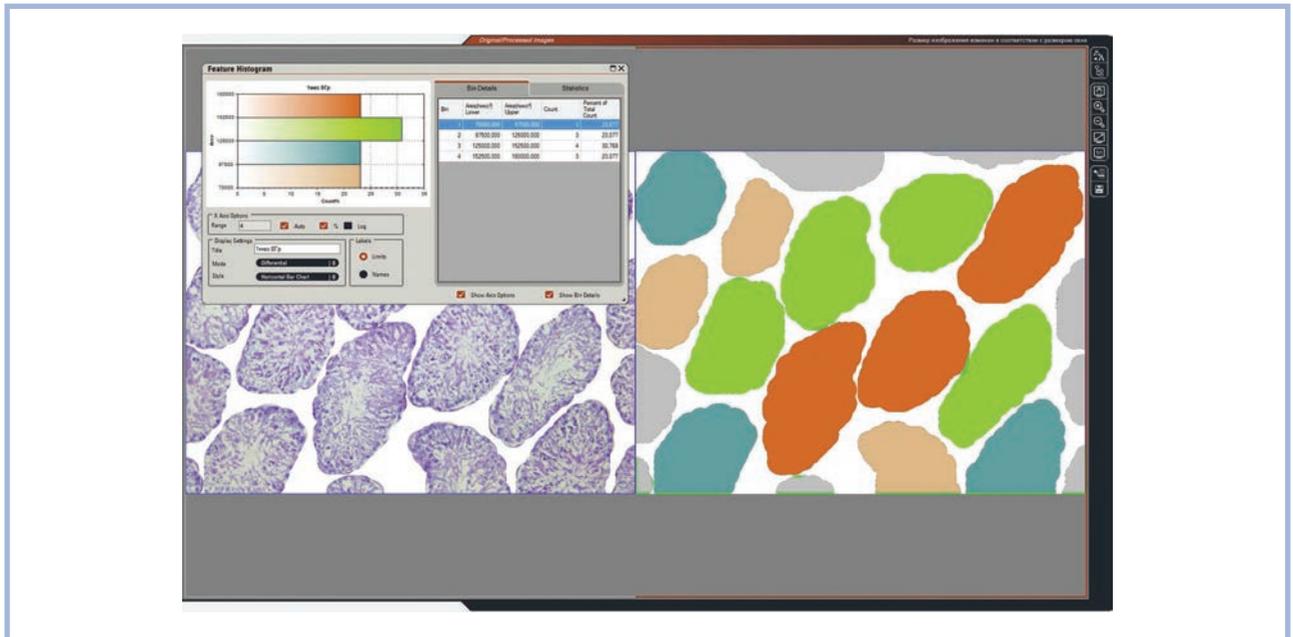


Рис. 2. Морфометрическое исследование семенников с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображения Leica Application Suite (LAS): сравнительный анализ извитых семенных канальцев.

Fig. 2. Morphometric examination of the testes using software for image processing and analysis Leica Application Suite (LAS): comparative analysis of convoluted seminiferous tubules.

ем программного обеспечения (ПО) для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 (рис. 2). В каждом из полей рассчитывали следующие параметры: высоту сперматогенного эпителия, количество сперматогоний, сперматоцитов, сперматид, а также клеток Сертоли и Лейдига [6].

Western blot-анализ экспрессии белка каспазы-3. Экспрессию белка каспазы-3 и ее активной формы, расщепленной каспазы-3, измеряли с помощью вестерн-блоттинга. Концентрацию белка в гомогенизированных образцах определяли по методу Брэдфорда. Затем 25 мкг белка разделяли на 12% SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GeneTex, clone GTX110543, 1:600). Мембрану блокировали 5% обезжиренным сухим молоком (Sigma, 70166) в трис-буферном физиологическом растворе (TBS). В качестве стандарта использовали иммуноокрашивание глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Единица измерения — нмоль рNA/мг белка С. Визуализацию осуществляли с помощью набора для иммунохемилюминесценции Novex ECL Reagents (Invitrogen, США).

Рентгеновская микротомография (микро-КТ). После фиксации семенники помещали на 18 ч в 1% раствор йода в 100% спирте с последующим промыванием в течение 1 ч в 100% спирте и далее переносили в пластиковую емкость, заполненную 100% спиртом для последующего сканирования.

Контрастированные семенники были визуализированы при помощи рентгеновского томографа Bruker Skyscan 1276 (Bruker, Бельгия) с напряжением 65 кВ, силой тока 200 мкА и алюминиевым фильтром толщиной 0,5 мм. Была выполнена 1801 проекция с вокселем 10 мкм. Затем полученные проекции были реконструированы в программе NRecon (Bruker, Бельгия) и экспортированы в виде последовательности изображений в формате tif в программу ORS Dragonfly (The Objects, Канада) для дальнейшего ана-

лиза. Для улучшения качества изображения срезы в двумерных проекциях были суммированы с подбором оптимальных значений электронного окна (рис. 3).

Статистический анализ. Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12.00 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между группами использовали следующие непараметрические критерии: *U*-критерий Манна—Уитни, *H*-критерий Краскела—Уоллиса; рассчитывали средние арифметические величины с их предельными отклонениями и среднеквадратичную ошибку. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers). Сравнение между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA со значимостью $p < 0,01$.

Результаты

Уровни половых гормонов (общий тестостерон, ФСГ, ЛГ) в контрольной и опытных группах на всем протяжении эксперимента не показали достоверных различий и находились в пределах нормы в соответствии с полом и возрастом животных (таблица).

Масса тела животных 2—4-й опытных групп на 7-е сутки после облучения электронами в дозе 8 Гр уменьшилась в среднем на 35% по сравнению с контрольной с последующим незначительным восстановлением в 3-й и 4-й группах к концу эксперимента.

Масса и объем семенников в опытных группах спустя неделю после облучения электронами уменьшились в 2 раза ($0,71 \pm 0,02$ г, $p < 0,01$; $688,7 \pm 32,7$ мкм³, $p < 0,01$) по сравнению с контрольной ($1,5 \pm 0,1$ г, $p < 0,01$; $1384,5 \pm 91,3$ мкм³, $p < 0,01$), что составляет в среднем 0,3% потери от общей

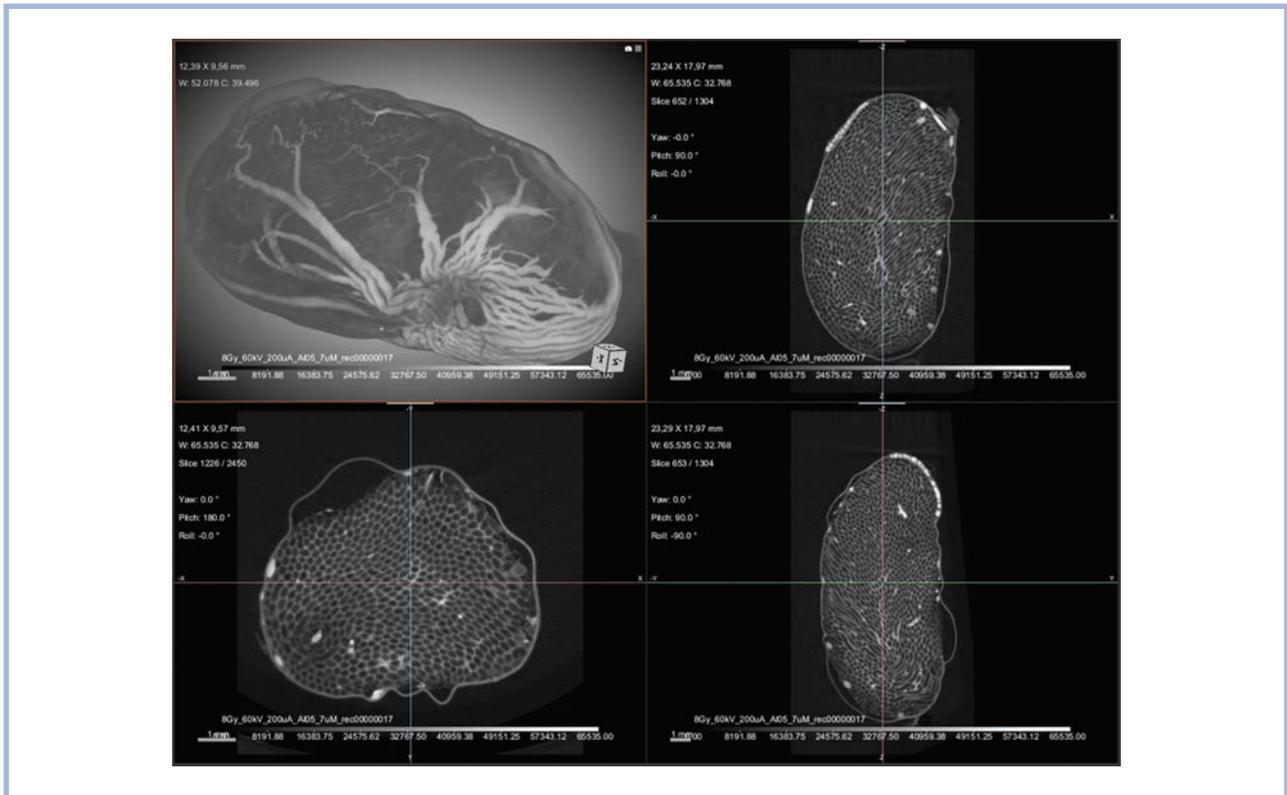


Рис. 3. Микротомограмма семенников с использованием рентгеновского томографа Bruker Skyscan.

Fig. 3. Microtomogram of the testes using a Bruker Skyscan.

Уровень половых гормонов в контрольной и опытных группах (M±SD)

The level of sex hormones in the control and experimental groups

Гормон, нмоль/л	Контроль	8IR	8IR+LP-PRP+IGF	8IR+LP-PRP	LP-PRP
Тестостерон	10,7±0,2	10,6±0,1	10,7±0,2	10,5±0,3	10,8±0,1
ФСГ	4,4±0,3	4,5±0,2	4,6±0,2	4,3±0,1	4,5±0,2
ЛГ	3,2±0,3	3,1±0,3	3,5±0,1	3,4±0,2	3,3±0,1

Примечание. M — значение; SD — стандартное отклонение.

массы тела. Снижение этих показателей прогрессировало во 2-й группе и к 84-м суткам было в 3,6 раза меньше (0,41±0,01 г, $p<0,01$; 275,9±14,3 мкм³, $p<0,01$) по сравнению с группой контроля. На фоне введения LP-PRP + IGF у крыс 3-й группы, начиная с 42-х суток, отмечали увеличение массы и объема семенников (0,91±0,05 г, $p<0,01$; 997,1±26,8 мкм³, $p<0,01$). Практически аналогичная картина наблюдалась в 4-й группе (0,81±0,01 г, $p<0,01$; 837,2±21,0 мкм³, $p<0,01$). Уменьшение массы и объема семенника в группе облучения электронами в дозе 8 Гр также подтверждено результатами микро-КТ (рис. 4).

В периканаликулярном пространстве семенников облученных животных отмечали интерстициальный отек и разрастание волокнистого компонента, а также стаз в просветах кровеносных сосудов мелкого калибра; лимфатические сосуды расширенные, «пустые». Эти изменения визуализировали на микро-КТ (см. рис. 4).

Микроскопическая оценка. При световой микроскопии срезов семенников контрольной группы наблюдали нормальную гистоархитектонику с физиологическим сперматогенезом (рис. 5, а).

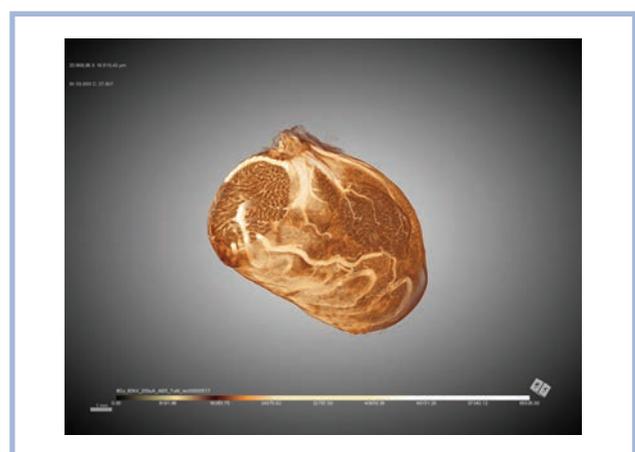


Рис. 4. Микротомограмма семенника, облученного электронами в дозе 8 Гр с контрастированием на 84-е сутки.

Fig. 4. Microtomogram of the testis irradiated with electrons at a dose of 8 Gy with contrast on 84 days.

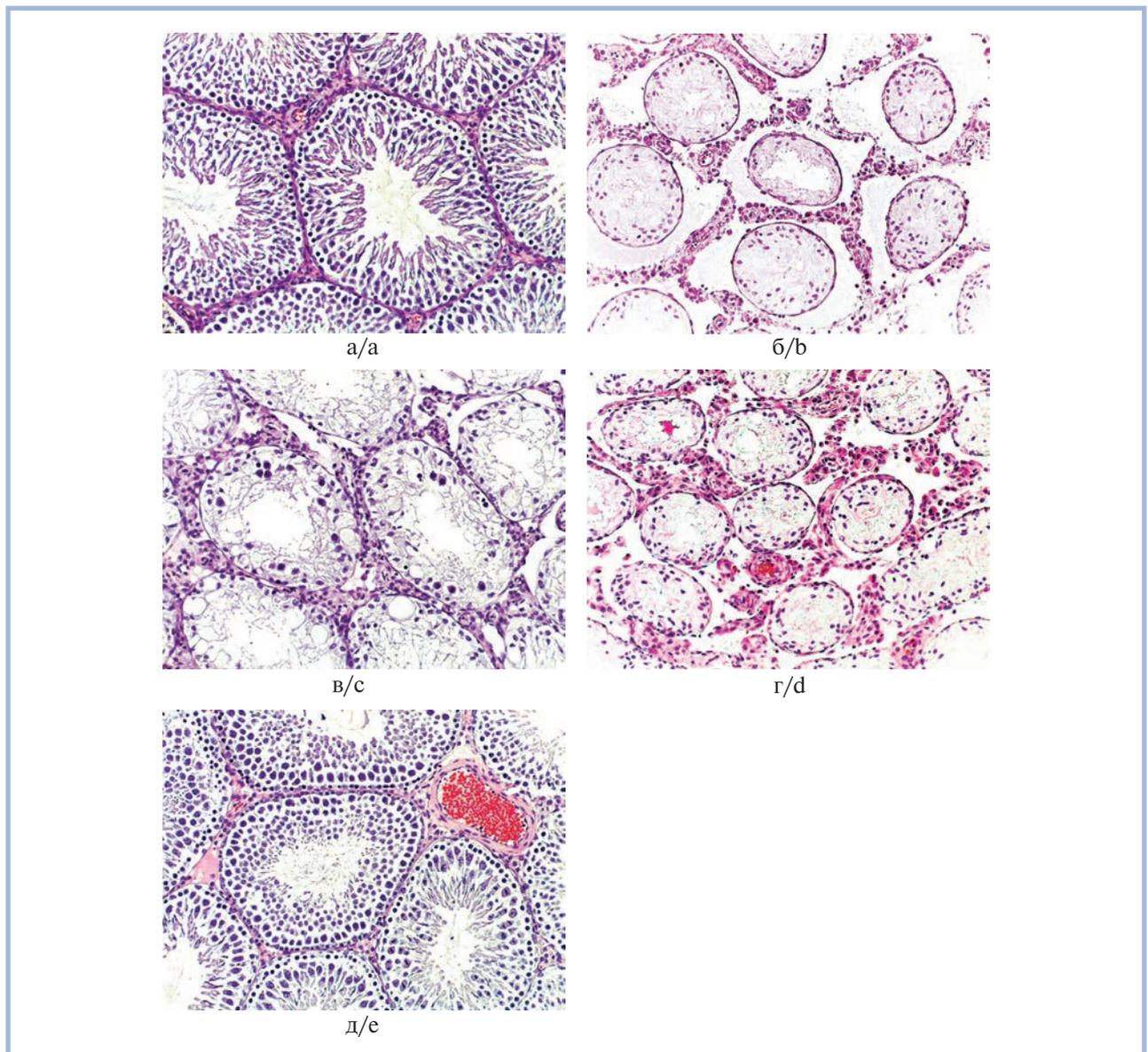


Рис. 5. Микроскопическая картина семенников на 84-е сутки эксперимента.

а — контроль; б — после облучения электронами в дозе 8 Гр (8IR); в — после облучения электронами в дозе 8 Гр и введения плазмы, обогащенной тромбоцитами с инсулиноподобным фактором роста-1 (8IR+LP-PRP+IGF); г — после облучения электронами в дозе 8 Гр и введения плазмы, обогащенной тромбоцитами (8IR+LP-PRP); д — после введения плазмы, обогащенной тромбоцитами (LP-PRP). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 5. Testes of rats at 84 day of the experiment.

а — control; б — after irradiation with electrons at a dose of 8 Gy (8IR); в — after irradiation with electrons at a dose of 8 Gy and administration of plasma enriched in platelets with insulin-like growth factor (8IR+LP-PRP+IGF); г — after irradiation with electrons at a dose of 8 Gy and administration of platelet-rich plasma (8IR+LP-PRP); д — after administration of platelet-rich plasma (LP-PRP). H&E, $\times 200$.

В группе облучения электронами в дозе 8 Гр (2-я группа) уже на 7-е сутки в $\frac{1}{3}$ семенных канальцев обнаружили появление дегенеративных сперматид и сперматоцитов, объединенных в семенные шары (площадь 0,7 μm^2 ; диаметр 0,9 μm ; $p < 0,01$), — крупные структуры с множественными пикнотичными ядрами и интенсивно окрашенной оксифильной цитоплазмой (7—8 поврежденных канальцев в поле зрения) (рис. 5, б).

Высота сперматогенного эпителия к концу эксперимента уменьшилась более, чем в 2,5 раза у крыс, облученных электронами, по сравнению с контрольной

группой ($p < 0,01$). На фоне введения LP-PRP отмечали незначительное увеличение высоты сперматогенного эпителия уже на 42-е сутки от начала эксперимента, а введение комбинации LP-PRP+IGF-1 (3-я группа) сократило срок восстановления высоты сперматогенного эпителия на 2 нед по сравнению с 4-й группой (рис. 6).

Количество половых клеток. В опытных 2—4-й группах через неделю после облучения наблюдали резкое снижение количества сперматогоний (более чем на $\frac{1}{2}$), первичных и вторичных сперматоцитов и сперматозоидов, дистрофические изменения и аутолиз сперматид, появление

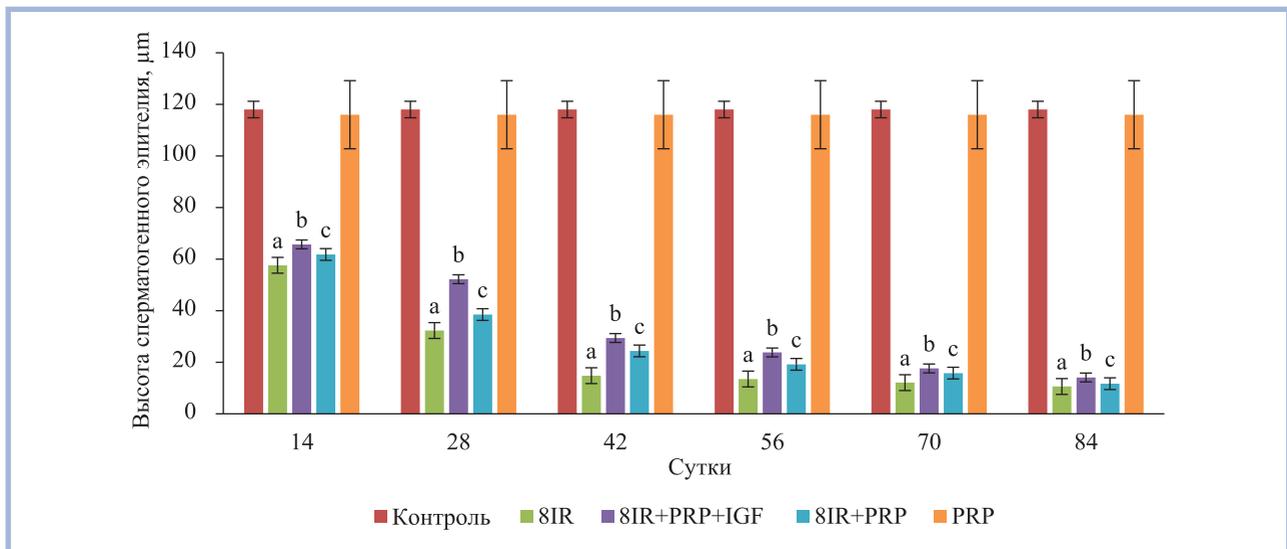


Рис. 6. Показатели высоты сперматогенного эпителия в контрольной и опытных группах.

^a $p < 0,01$ (контроль и 8IR), ^b $p < 0,01$ (8IR и 8IR+LP-PRP+IGF), ^c $p < 0,01$ (8IR и 8IR+LP-PRP).

Fig. 6. The height of the germinal epithelium in the control and experimental groups.

^a $p < 0.01$ (control vs 8IR), ^b $p < 0.01$ (8IR vs 8IR+LP-PRP+IGF), ^c $p < 0.01$ (8IR vs 8IR+LP-PRP).

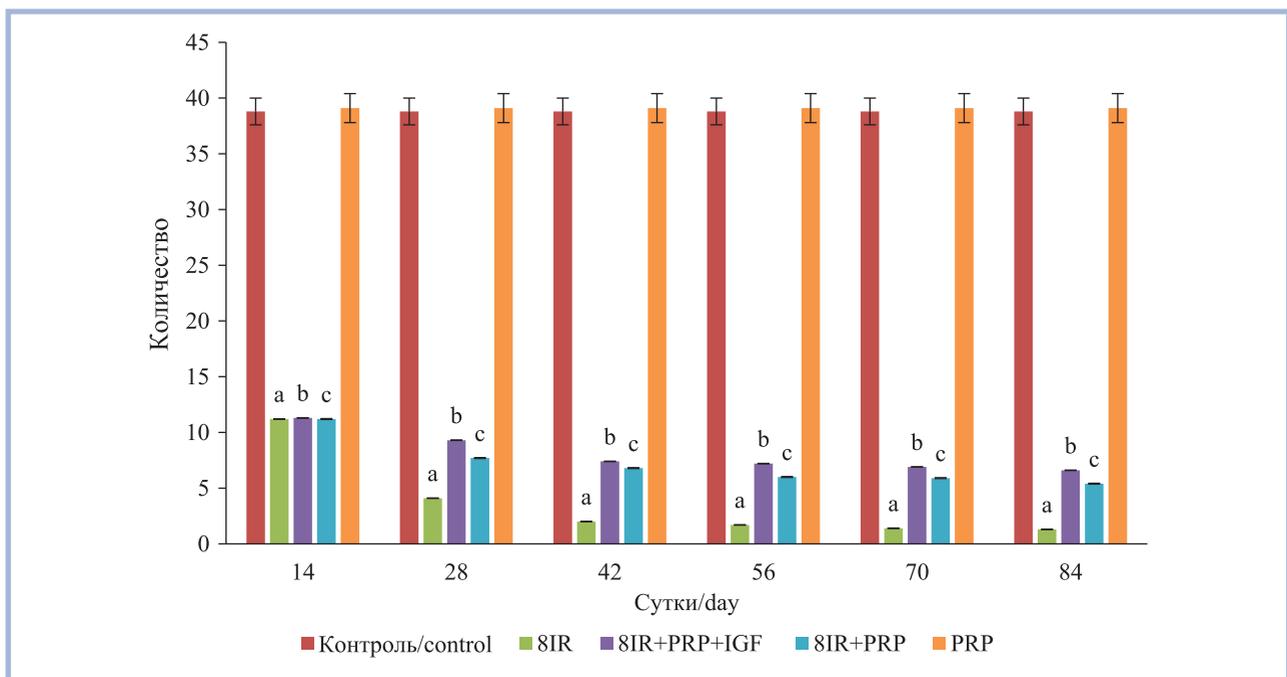


Рис. 7. Количество сперматогоний в контрольной и опытных группах.

^a $p < 0,01$ (контроль и 8IR), ^b $p < 0,01$ (8IR и 8IR+LP-PRP+IGF), ^c $p < 0,01$ (8IR и 8IR+LP-PRP).

Fig. 7. Number of spermatogonia in control and experimental groups.

^a $p < 0.01$ (control vs 8IR), ^b $p < 0.01$ (8IR vs 8IR+LP-PRP+IGF), ^c $p < 0.01$ (8IR vs 8IR+LP-PRP).

пикнотических ядер в первичных сперматоцитах; местами гистологическая картина суб- и тотальной герминальной аплазии сохранялась вплоть до окончания эксперимента во 2-й группе (рис. 5, б, рис. 7).

В семенниках на фоне введения LP-PRP+IGF (3-я группа) снижение доли половых клеток (гипосперматогенез) было менее выражено по сравнению со 2-й группой облученных животных: разница в количестве сперма-

тогоний составила на 42-е сутки 3,7 раза, а на 84-е сутки — 5 раз (см. рис. 7).

Начиная с 70-х суток эксперимента выраженные дистрофические изменения и герминальная аплазия сперматогенного эпителия во 2–4-й группах затрудняли дальнейшую дифференцировку половых клеток.

К концу эксперимента количество сперматогоний у животных 2-й и 4-й групп было снижено по сравне-

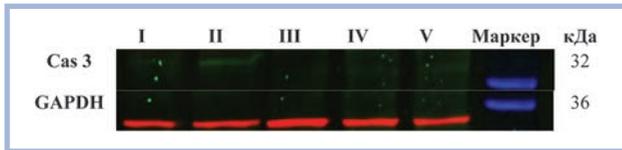


Рис. 8. Фосфорилирование Cas3 в семенниках контрольной и опытных групп.

Три образца ткани семенника каждой группы объединяли и проводили через вестерн-блоттинг. Экспрессия каспазы-3 в тканях семенников измерялась в нмоль pNA на 1 мг белка С: контроль (I); 8IR (II); 8IR+LP-PRP+IGF (III); 8IR+LP-PRP (IV); LP-PRP (V). В качестве стандарта использовали иммуноокрашивание глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Иммунохемилюминесценция.

Fig. 8. Phosphorylation of Cas3 in testes in control and experimental groups.

Three testicular tissue samples from each group were pooled and performed through Western blotting. Expression of caspase-3 in testicular tissues was measured in nmol pNA/mg protein C: control (I); 8IR (II); 8IR+LP-PRP+IGF (III); 8IR+LP-PRP (IV); LP-PRP (V). Immunostaining with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a standard. Immunochemiluminescence.

нию с группой контроля в 29,8 и 7,2 раза соответственно, а другие популяции половых клеток обнаружены не были. В то же время в 3-й группе на фоне LP-PRP+IGF в извитых семенных канальцах имелись сперматогонии и единичные сперматоциты, однако их количество по сравнению с контрольной группой было снижено в 5,8 раза ($6,6 \pm 0,03$, $p < 0,01$) и 78,5 раза ($1,2 \pm 0,1$, $p < 0,01$) соответственно (см. рис. 5, в, г, рис. 7).

Количество клеток Сертоли и Лейди́га. Во 2–4-й экспериментальных группах наблюдали незначительное снижение количества клеток Сертоли. Количество клеток Лейди́га в группе облучения электронами увеличилось по сравнению с группой контроля в 1,9 раза ($14,5 \pm 0,02$, $p < 0,01$) к концу эксперимента, а в группах 8IR+LP-PRP+IGF и 8IR+LP-PRP — в 1,7 раза ($12,7 \pm 0,01$, $p < 0,01$) и 1,8 раза ($13,6 \pm 0,01$, $p < 0,01$) соответственно.

Western blot. Согласно анализу вестерн-блоттинга, экспрессия каспазы-3 увеличилась в 6 раз в ткани семенников облученных крыс по сравнению с крысами контрольной группы ($p < 0,001$). Экспрессия каспазы-3 снижалась после введения LP-PRP+IGF и LP-PRP по сравнению с группой облученных животных в 2 и 1,8 раза соответственно ($p < 0,001$) (рис. 8).

Необлученные животные 5-й группы, которым вводили LP-PRP, на протяжении эксперимента не показали достоверных отличий по всем изученным параметрам по сравнению с контрольной группой (рис. 5, д).

Обсуждение

Настоящее исследование посвящено изучению состояния сперматогенеза на модели локального β -облучения (линейный акселератор NOVAC-11; доза 8 Гр, мощность дозы 1 Гр/мин, энергия 10 МэВ, частота 9 Гц, размер поля $\varnothing 100$ мм) и реабилитации вызванных облучением нарушений сперматогенеза экзогенными факторами роста тромбоцитов.

Обнаруженное прогрессирующее снижение массы и объема семенников (по данным микро-КТ) после облучения объясняется уменьшением высоты сперматоген-

ного эпителия и количества половых клеток. Выявленные изменения сопровождались гиперплазией клеток Лейди́га компенсаторного генеза, обусловленного отрицательной обратной связью гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси.

Дистрофические поражения половых клеток, появление семенных шаров, а также дезорганизация и аплазия семенных канальцев связаны с токсическим действием ионизирующего излучения прежде всего на сперматогонии вследствие повреждения клеточных мембран и макромолекул, нарушения работы сигнальных путей MAPK, PI3K, NF κ B, синтеза белков семейства ErbB и факторов клеточного дыхания из-за быстрой генерации активных форм кислорода (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2), продуктов перекисного окисления липидов и радиолиза воды (H^\cdot и e_{aq}^-), реактивных форм азота (ONOO^- , ONOOH , NO_2^\cdot , N_2O_3) и др. [4]. Сформировавшийся дисбаланс между активными формами кислорода (и других токсических веществ) и антиоксидантной защитой у облученных крыс приводит к активации каспазного каскада и, как следствие, к апоптотической гибели половых клеток, что подтверждается результатами вестерн-блоттинга в нашем эксперименте.

Многие исследователи доказали высокую способность биологически активных веществ, содержащихся в α -гранулах тромбоцитов, активировать регенерацию клеток и тканей — положительную роль этих факторов в процессах регуляции дифференцировки, митоза, метаболизма и хемотаксиса [10, 11]. По результатам вестерн-блоттинга обнаружено, что экспрессия проапоптотического белка каспазы-3 достоверно выше в группе облучения, однако значимо снижена в группах, которые получали лечение LP-PRP+IGF-1 и LP-PRP. Это свидетельствует о модуляции факторами роста порога апоптоза и апоптотической активности половых клеток семенника и объясняется лабильностью экстрацеллюлярных сигналов, ответственных за регуляцию клеточного роста.

Известно, что LP-PRP способна стимулировать антиоксидантную защиту, ангиогенез и регенеративные процессы в ответ на облучение, так как некоторые факторы роста положительно влияют на пролиферацию (PDGF, FGF7, EGF, IGF-1), дифференцировку (EGF, IGF-1), восстановление и обновление сперматогенного эпителия (TGF- β , IGF-1) [17]. В связи с глубоким поражением извитых семенных канальцев после облучения электронами в дозе 8 Гр проявление положительных эффектов перечисленных факторов роста в 3-й и 4-й группах оказалось менее манифестным по сравнению с таковым в группе, получившей сочетанное лечение LP-PRP+IGF-1.

Рекомбинантный IGF-1 был выбран в качестве дополнительного репаративного индуктора, так как является мощным стимулятором пролиферации и дифференцировки половых клеток, опосредуя свои эффекты через MAPK- и PI3K-сигнальные пути, которые регулируют клеточный цикл [9, 18]. Инъекции этого фактора роста замедлили процесс апоптоза, запускаемого облучением, что подтверждалось снижением экспрессии каспазы-3, и незначительно стимулировали восстановление стромального компонента семенников.

Заключение

Введение факторов роста и других биологически активных веществ, содержащихся в α -гранулах тромбоцитов LP-PRP, приводит к заметному улучшению количествен-

ных и качественных показателей сперматогенеза, существенно сниженных в результате локального облучения гонад электронами. Дополнительное введение IGF-1 еще более противодействует развитию и проявлению негативных эффектов облучения, усиливая активность регенерации сперматогенеза.

Продолжение исследований патогенеза мужского бесплодия в условиях радиоактивного облучения гонад и роли LP-PRP в его лечении будет способствовать формированию более глубокого понимания механизмов действия факторов роста как в норме, так и в процессе структурно-функциональной реабилитации после такого рода повреждений.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Г.А. Демяшкин, Т.Г. Боровая, Ю.Ю. Андреева

Сбор и обработка материала — С.Н. Корякин, В.И. Щекин, М.А. Вадюхин

Статистическая обработка — С.Н. Корякин, М.А. Вадюхин

Написание текста — Г.А. Демяшкин, М.А. Вадюхин

Редактирование — Г.А. Демяшкин, Т.Г. Боровая, Ю.Ю. Андреева

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62:2-10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Jafari H, MirzaiiAjmabadi K, Roudsari RL, Rakhshkhorshid M. The factors affecting male infertility: A systematic review. *Int J Reprod Biomed*. 2021;19(8):681-688. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i8.9615>
- Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis: The role of testicular immunology. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):957. <https://doi.org/10.3390/ijms20040957>
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdud CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(2):260-292. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>
- Ogilvy-Stuart AL, Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect*. 1993;101(2):109-116. <https://doi.org/10.1289/ehp.93101s2109>
- Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуковицкая В.Г., Андреевская С.Г., Шевлягина Н.В. Микрочастицы тромбоцитов: формирование и свойства. *Патогенез*. 2017;15(2):4-13. Kubatiev AA, Borovaya TG, Zhukovitskaya VG, Adreevskaya SG, Shevlyagina NV. Platelet microparticles: formation and properties. *Patogenez=Pathogenesis*. 2017;15(2):4-13. (In Russ.).
- Maria-Angeliki G, Alexandros-Efstratios K, Dimitris R, Konstantinos K. Platelet-rich plasma as a potential treatment for noncicatricial alopecias. *Int J Trichol*. 2015;7(2):54-63. <https://doi.org/10.4103/0974-7753.160098>
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-870. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>
- Martins RP, Hartmann DD, de Moraes JP, Soares FA, Puntel GO. Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats. *Platelets*. 2016;27(8):784-790. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1184752>
- Griffeth RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl*. 2014;24:12. <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-12>
- Caires KC, de Avila JM, Cupp AS, McLean DJ. VEGFA family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis in vivo. *Endocrinology*. 2012;153(2):887-900. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1323>
- Sekerci CA, Tanidir Y, Sener TE, Sener G, Cevik O, Yarat A, Alev-Tuzuner B, Cetinel S, Kervancioglu E, Sahan A, Akbal C. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Urol*. 2017;13(3):317.e1-317.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2016.12.016>
- Yao J, Zuo H, Gao J, Wang M, Wang D, Li X. The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(3):840-847. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.125>
- Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7794. <https://doi.org/10.3390/ijms21207794>
- Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med*. 2010;83(1):1-9.
- Ozcan P, Takmaz T, Tok OE, Islek S, Yigit EN, Ficioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administered on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(4):865-873. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01689-7>
- Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard JP, Benahmed M. Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50(1):203-212. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)01461-4](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(01)01461-4)
- Fu S, Yin L, Lin X, Lu J, Wang X. Effects of Cyclic Mechanical Stretch on the Proliferation of L6 Myoblasts and Its Mechanisms: PI3K/Akt and MAPK Signal Pathways Regulated by IGF-1 Receptor. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1649. <https://doi.org/10.3390/ijms19061649>

Поступила 02.11.2021

Received 02.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких

© И.В. ДВОРАКОВСКАЯ¹, С.Н. БУГРОВ², Л.Н. НОВИКОВА¹, С.А. СКРЯБИН³, Б.М. АРИЭЛЬ²

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

³ГБУЗ «Мурманская областная клиническая больница им. П.А. Баяндина», Мурманск, Россия

РЕЗЮМЕ

В статье описаны клинико-рентгенологические и патолого-анатомические особенности эпителиоидно-клеточной гемангиоэндотелиомы (ЭГЭ) у 27 взрослых больных преимущественно женского пола. Во всех случаях, за исключением одного, отмечалось доброкачественное развитие заболевания на протяжении долгих лет с тенденцией к стабилизации роста, морфологическим признаком чего послужило развитие распространенных склеротических изменений. С помощью иммуногистохимического исследования подтверждены эндотелиальная природа клеток ЭГЭ и относительно низкий ее пролиферативный потенциал. Клинико-морфологические особенности ЭГЭ ставят вопрос о сущности пролиферации эндотелиоцитов с формированием опухолевидных узлов. Есть все основания рассматривать ЭГЭ как псевдоопухоль типа нодозной гиперплазии в нозологической группе дисгормональной гиперплазии, подобно доброкачественной лейомиоме матки с поражением легких, как это ранее было предложено нами.

Ключевые слова: легкие, опухоли легких, эпителиоидно-клеточная гемангиоэндотелиома, пролиферация эндотелиоцитов, иммуногистохимическое исследование, нодозная дисгормональная гиперплазия.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Двораковская И.В. — <https://orcid.org/0000-0002-0333-751X>

Бугров С.Н. — <https://orcid.org/0000-0001-5150-9518>

Новикова Л.Н. — <https://orcid.org/0000-0001-9064-1554>

Скрябин С.А. — e-mail: stas911@mail.ru

Ариэль Б.М. — <https://orcid.org/0000-0002-7243-8621>

Автор, ответственный за переписку: Ариэль Б.М. — e-mail: arielboris@rambler.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Двораковская И.В., Бугров С.Н., Новикова Л.Н., Скрябин С.А., Ариэль Б.М. Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких. *Архив патологии*. 2022;84(2):29–35. <https://doi.org/10.17116/patol20228402129>

Pulmonary epithelioid hemangioendothelioma

© I.V. DVORAKOVSKAYA¹, S.N. BUGROV², L.N. NOVIKOVA¹, S.A. SKRYABIN³, B.M. ARIEL²

¹I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia;

³Murmansk Regional Clinical Hospital, Murmansk, Russia

ABSTRACT

The article describes the clinical, radiological and pathological features of epithelioid hemangioendothelioma (EHE) in 27 adult patients, mainly female. In all cases, with the exception of one, there was a benign course of the disease over many years with a tendency to stabilize growth, the morphological sign of which was the development of widespread sclerotic changes. With the help of immunohistochemical method, the endothelial nature of EHE cells and its relatively low proliferative potential were confirmed. Clinical and morphological features of EHE raise the question of the essence of proliferation of endothelial cells with the formation of tumor-like nodes. There is every reason to consider EHE as a pseudotumor of the type of nodose hyperplasia in the nosological group of dyshormonal hyperplasia, similar to benign leiomyoma of the uterus with lung damage, as we have previously proposed.

Keywords: lungs, lung tumors, epithelioid hemangioendothelioma, proliferation of endothelial cells, immunohistochemical study, nodose dyshormonal hyperplasia.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Dvorakovskaya I.V. — <https://orcid.org/0000-0002-0333-751X>

Bugrov S.N. — <https://orcid.org/0000-0001-5150-9518>

Novikova L.N. — <https://orcid.org/0000-0001-9064-1554>

Skryabin S.A. — e-mail: stas911@mail.ru

Ariel B.M. — <https://orcid.org/0000-0002-7243-8621>

Corresponding author: Ariel B.M. — e-mail: arielboris@rambler.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Dvorakovskaya IV, Bugrov SN, Novikova LN, Skryabin SA, Ariel BM. Pulmonary epithelioid hemangioendothelioma. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):29–35. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402129>

Эпителиоидно-клеточная гемангиоэндотелиома (ЭГЭ) — это необычное новообразование, встречающееся в легких, печени, костях и других органах [1–3] и отличающееся несомненным клинико-рентгенологическим, гистологическим и молекулярно-генетическим своеобразием, не лишенным специального интереса. ЭГЭ относится к числу редко встречающихся опухолей. Частота встречаемости не превышает 1 случай на 1 млн населения в год [4]. Эта опухоль получила широкую известность за последние 50 лет, впервые ЭГЭ была описана D.H. Dale и A.A. Liebow [5] под названием «внутрисосудистая склерозирующая бронхиолоальвеолярная карцинома легкого». Термин «эпителиоидная гемангиоэндотелиома легкого» был предложен S.W. Weiss и F.M. Enzinger [6].

В отечественной и зарубежной литературе описываются, как правило, лишь единичные наблюдения ЭГЭ [7–12]. Наиболее крупная серия исследований включает 93 больных [13].

При молекулярно-генетическом и иммуногистохимическом исследовании ЭГЭ у 90% больных обнаруживается слияние генов *WWTR1-SAMTA*, а у 10% — генов *WWTR1-SAMTA* и/или *YAPI-TFE3* [14, 15]. Выявление этих гибридных генов рекомендуется для подтверждения диагноза ЭГЭ с целью исключения диагнозов эпителиоидной гемангиомы и ангиосаркомы. Описаны и другие, более редкие транслокации гена *WWTR1*, когда последний сливается не с геном *SAMTA1*, а с другими генами. Вместе с тем наличие этих генетических особенностей ЭГЭ лишено прогностического смысла и не используется при обсуждении тактики ее лечения [16].

Итогом пристального внимания к ЭГЭ на протяжении многих лет стала попытка точно обозначить ее место в онкологии, предпринятая Европейским обществом медицинской онкологии (ESMO) и ознаменовавшаяся публикацией обзорной статьи с освещением всех современных представлений об эпидемиологии ЭГЭ, ее клинике, о рентгенологической и микроскопической диагностике, а также о лечении и прогнозе [17].

Несмотря на обилие фактических данных, полученных при изучении ЭГЭ с использованием богатейшего арсенала современных методов исследования, включая иммуногистохимические и молекулярно-генетические, это новообразование все еще остается, с нашей точки зрения, в известной мере *Ding an sich*, т.е. «вещью в себе». Хотя ЭГЭ включена в Международную классификацию опухолей и рассматривается там как сосудистая опухоль с низким

или промежуточным потенциалом злокачественности [18]; камнем преткновения по-прежнему является вопрос: есть ли достаточные основания для того, чтобы считать ее истинной опухолью?

Мы наблюдали 26 больных (21 женского пола) 15–60 лет (в среднем 41 ± 3 года) (табл. 1) и провели гистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов легких, полученных при видеоторакоскопии или открытой биопсии у этих больных. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, конго красным (на амилоид) и по Ван Гизону; ставили также PAS-реакцию.

Проводили иммуногистохимическое исследование на срезах парафиновых блоков с выявлением экспрессии CD31 (клон JC70A, ф. Dako), CD34 (клон QBEnd/10, ф. Dako), фибринстабилизирующего фактора (фактора XIII), индекса пролиферации опухоли Ki-67 (клон MIB-1, ф. Dako) и фактора транскрипции ERG (клон EPR3864, ф. Eri-tomics).

Во всех случаях заболевание начиналось, а порой и продолжалось бессимптомно, первые изменения были выявлены случайно на рентгенограммах при профилактическом осмотре. Основными клиническими симптомами были кашель, одышка, периодически кровохарканье, слабость и похудание. На рентгенограммах и при компьютерной томографии (КТ) в обоих легких определялись многочисленные образования округлой формы с ровными и четкими контурами, тканевой плотности. Заболевание протекало, как правило, вполне благоприятно, с тенденцией к стабилизации, и клиническая симптоматика оставалась минимальной или же медленно прогрессирующей, а общая продолжительность заболевания колебалась от 1 года до 20 лет. В большинстве случаев терапия была симптоматической (муколитики, ангиопротекторы и др.). Дифференциальная диагностика проводилась с диссеминированными и очаговыми изменениями легких различной этиологии, гематогенными метастазами опухолей, с метастазирующей лейомиомой матки и др. (табл. 2).

Иллюстрацией благоприятно протекающего заболевания служит одно из наших клинических наблюдений.

Больная С., 1966 года рождения. Считает себя больной с 2015 г., когда на фоне полного здоровья на профилактической флюорограмме были выявлены двусторонние диссеминированные изменения, подтвержденные КТ. Изменения расценивались как метастатические, что при дальней-

Таблица 1. Распределение больных по полу и возрасту

Table 1. Distribution of patients by sex and age

Пол	Возраст, лет						Итого
	15–20	21–30	31–40	41–50	51–60	неизвестен	
Женский		5	4	7	5	—	21
Мужской	1	—	1	—	1	—	3
Неизвестен	—	—	1	—	—	1	2
Всего	1	5	6	7	6	1	26

Таблица 2. Клинические диагнозы больных с ЭГЭ легких

Table 2. Clinical diagnoses of patients with pulmonary epithelioid hemangioendothelioma

Патологический процесс	Возраст, лет					Итого
	15–20	21–30	31–40	41–50	51–61	
Диссеминированные изменения в легких	1	2	4	5	5	17
Очаговые изменения в легких	1	—	—	2	1	4
Опухоли легких	—	1	1	1	—	3
Метастазы опухолей	—	—	1	1	—	2
Силикоз	—	—	1	—	—	1
Всего	2	3	7	9	6	27

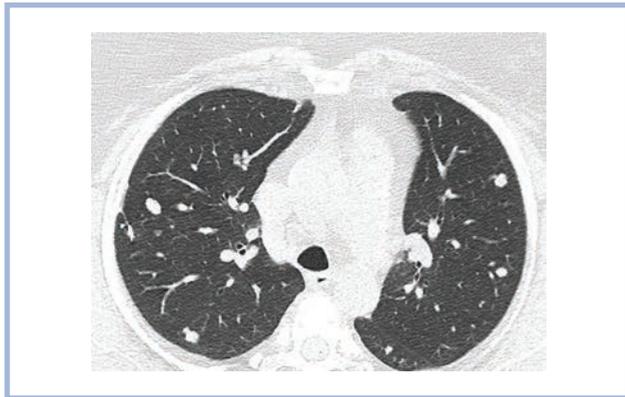


Рис. 1. Компьютерная томограмма легких больной С. Множественные очаги диаметром 11–14 мм в обоих легочных полях.

Fig. 1. Computed tomography image of the lungs of the patient S.

Multiple lesions with a diameter of 11–14 mm in both pulmonary fields.

шем обследовании не подтвердилось. Признаков легочной гипертензии не было. Комплексное исследование функции внешнего дыхания отклонений не выявило. Все лабораторные показатели в норме. На КТ в обоих легочных полях определялись множественные очаги диаметром 11–14 мм с неровными контурами, расположенные периваскулярно и субплеврально, отдельные очаги с кальцинатами и склонны к слиянию (рис. 1).

Для уточнения диагноза в 2016 г. была выполнена видеоторакоскопия с биопсией в области верхней доли правого легкого и поставлен диагноз: «эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких».

В дальнейшем на протяжении 5 лет жалоб по-прежнему не предъявляла. Изменения на КТ без существенной динамики, давление в легочной артерии в пределах нормы. Результаты лабораторного исследования без значимых отклонений от нормы.

При макроскопическом исследовании биоптатов легких, полученных при видеоторакоскопии или открытой биопсии, у 23 больных имелись многочисленные плотные очаги округлой или овальной формы диаметром от 0,3 до 2–3 см серовато-желтого цвета, без фиброзной капсулы, что подтверждалось и при микроскопическом исследовании (рис. 2, а); в 4 случаях определялось несколько более крупных узлов диаметром 2–4 см, также неинкапсулированных.

При микроскопическом исследовании легких выявлялись узелки в бронхиолах, альвеолярных ходах и в просвете

тах альвеол, куда они внедрялись по порам Кона. Местами новообразованная ткань напоминала полипы, заполнявшие просветы альвеол (рис. 2, б). При этом целостность эластического каркаса сохранялась. Окружающая легочная паренхима оставалась интактной, острые воспалительные изменения в ней не обнаруживались (рис. 2, в).

В опухолевых узлах определялись две зоны — центральная и периферическая.

Первая была представлена гомогенной розовой тканью типа бесклеточной гиалинизированной соединительной ткани, дававшей слабоположительную PAS-реакцию и окрашивавшейся альциановым синим и конго красным (рис. 2, г).

В периферической зоне, богатой клетками и капиллярами, представленными мелкопетлистой сетью или ориентированными в определенном направлении, определялись фибробласты, эпителиоидные клетки с насыщенными хроматином ядрами округлой или овальной формы, макрофаги с базофильной цитоплазмой, гистиоциты, своеобразные многоотростчатые и гигантские многоядерные клетки. Местами эти клетки лежали в просветах мелких артерий и вен, не нарушая целостности сосудистой стенки, или располагались рассеянно в миксоматозной строме в виде мелких скоплений, цепочек и тяжей, между которыми были видны капилляры с щелевидными просветами и сосудистые почки, лишенные просветов (рис. 3, а).

Гистологическое своеобразие этим очагам придавала межклеточная ткань, состоявшая из клеток и волокон в виде пучковых, муаровых или неориентированных образований. В структурах двух первых типов имелись веретенообразные клетки с плохо различимыми границами и узкими палочковидными ядрами. Муаровые структуры в виде широких и узких лент были образованы веретенообразными клетками, расположенными частоколом. Большой частью это были причудливо извивавшиеся ленты, состоявшие только из клеток или же по преимуществу волокнистые, в периферических отделах окруженные клетками, расположенными перпендикулярно по отношению к длине волокна. В некоторых полях зрения прослеживались переходы лент в пучки веретенообразных клеток или же в клеточные комплексы без какой-либо определенной ориентировки клеток.

Особенности морфологической картины ЭГЭ определяются в известной мере наличием капиллярных сетей, главным образом характером фиброобразования, выраженным в неодинаковой степени не только у разных больных, но и в различных участках новообразования у одной и той же больной, что видно при окраске по Ван Гизону. Как уже было сказано выше, есть отчетливая тенденция к более значительному фиброобразованию в центральной зоне очагов (см. рис. 2, г). Встречаются очаги, состо-

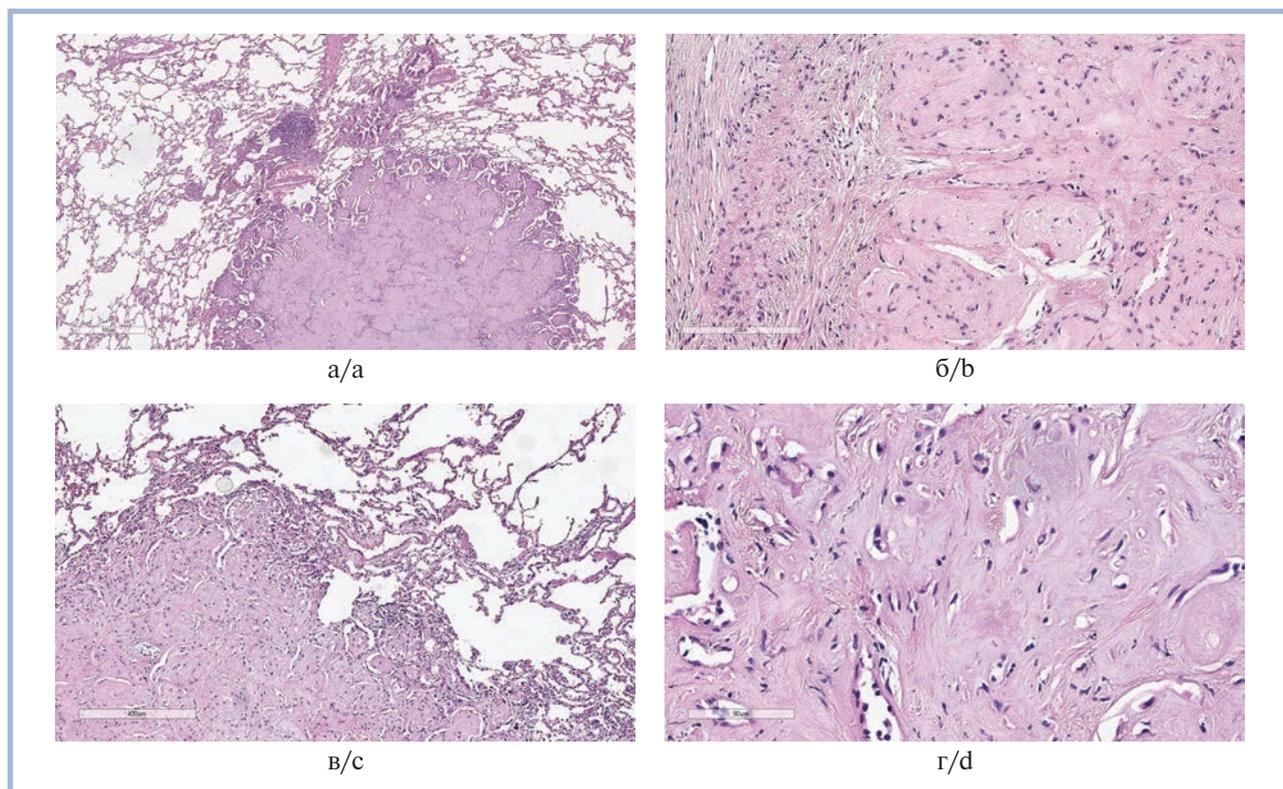


Рис. 2. Микроскопическая картина эпителиоидной гемангиоэндотелиомы легких.

а — мелкий неинкапсулированный узелок новообразования в воздушной легочной ткани, $\times 120$; б — «полипы», заполнившие альвеолы, $\times 400$; в — легочная паренхима вокруг узелка новообразования без воспалительных изменений, $\times 100$; г — бедная клетками соединительная ткань с гиалинизацией центра узелка, $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Microscopic picture of the pulmonary epithelioid hemangioendothelioma

а — small non-encapsulated neoplasm nodule in the normal lung tissue, $\times 120$; б — «polyps» filling the alveoli, $\times 400$; в — lung parenchyma around the neoplasm nodule without inflammatory changes, $\times 100$; д — cell-scarce connective tissue with hyalinization of the center of the nodule, $\times 400$. H&E.

ящие сплошь из рубцовой и гиалинизированной ткани, напоминающие отложения амилоида и окрашивающиеся конго красным, но неспособные к лучепреломлению в поляризованном свете.

Ориентировка волокнистых структур и клеток согласована друг с другом, иначе говоря, обращает на себя внимание то, что в участках с пучковой или муаровой структурой фиброзные волокна проходят в том же направлении, что и клетки, тогда как в неориентированных структурах такая согласованность не прослеживается. В тех полях зрения, где фиброз и гиалиноз выражены особенно значительно, капилляры запустевают и сохраняются только их контуры (см. рис. 2, г).

При иммуногистохимическом исследовании в опухолевых клетках с заметным постоянством выявлялась экспрессия CD31, CD34, фибринстабилизирующего фактора (фактора XIII), фактора транскрипции ERG (рис. 3, б—г). Индекс пролиферации Ki-67 был невелик и у разных больных колебался в пределах 2—10%.

Та редкость, с какой встречается ЭГЭ (1:1 000 000, как сказано выше), нисколько не согласуется с изрядным числом ее описаний в литературе, особенно в последние годы, когда открылся простор для исследования опухолей в новом свете с иммуногистохимических и молекулярно-генетических высот. Всеми исследованиями было подтверждено, что эпителиоидные клетки этого новообразования суть эндотелиоциты, тем самым завершив дискуссию, ве-

дущую начало от D.H. Dail и A.A. Liebow [5], полагавших что опухоль состоит не из эпителиоидных, а из эпителиальных клеток и потому должна обозначаться как «внутрисосудистая склерозирующая бронхиолоальвеолярная карцинома».

Эндотелиоциты и в самом деле принимают живейшее участие в формировании ЭГЭ, что отмечали первооткрыватели этой патологии; на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и пикрофуксином, ими были описаны веретенообразные клетки, выстилавшие щелевидные просветы капиллярных сетей. При электронной микроскопии в цитоплазме клеток, входящих в состав гнезд и тяжей новообразования, обнаруживаются многочисленные пиноцитозные пузырьки и тельца Вейбеля—Паладе как характерный атрибут эндотелиоцитов. В некоторых клетках число пузырьков столь велико, что они заполняют почти весь объем клетки, отесняя ядро к периферии и значительно деформируя его. Такие клетки приобретают разительное сходство с перстневидными эпителиальными клетками и неудивительно, что в первых описаниях ЭГЭ относили к раковым опухолям [5].

Эндотелиальная природа многих клеточных элементов ЭГЭ подтверждается и в наших наблюдениях, когда при иммуногистохимическом исследовании выявляется экспрессия типичных биомаркеров эндотелиоцитов. Зарубежные и отечественные авторы относили ЭГЭ к категории эндотелиом.

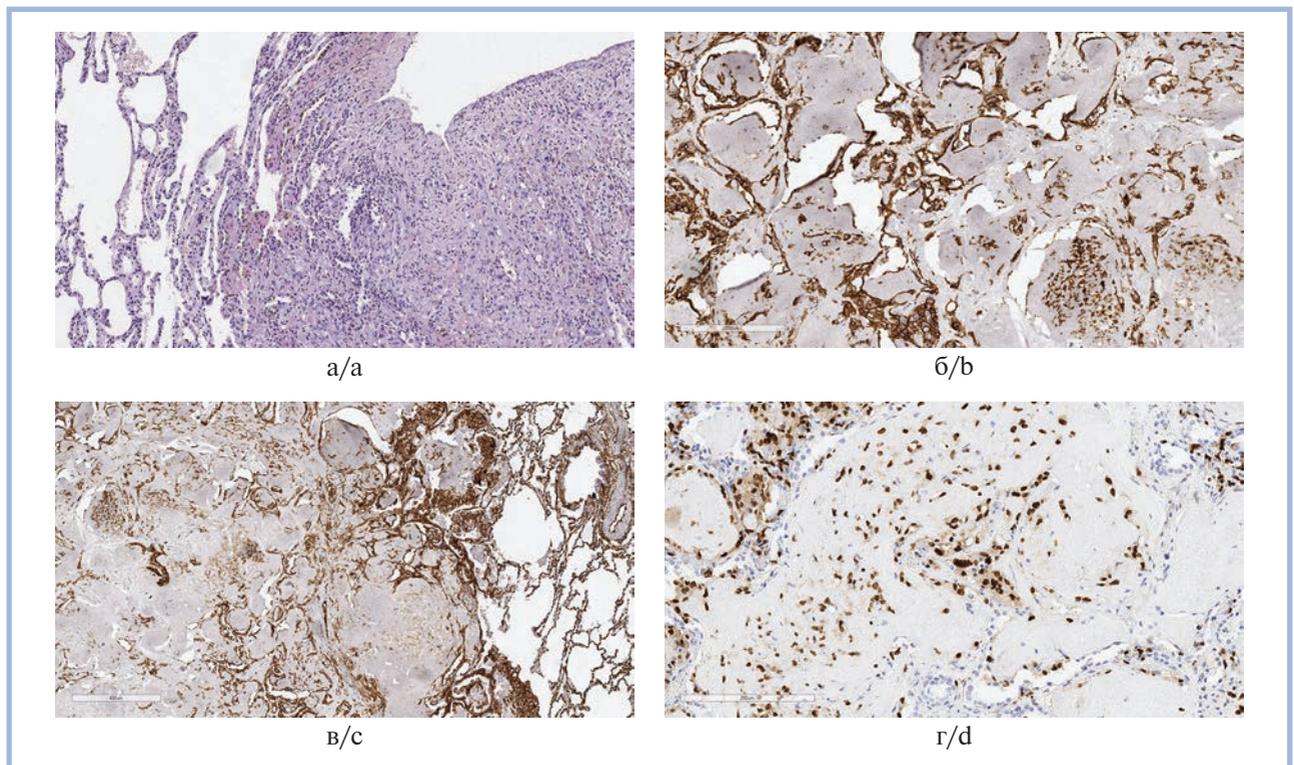


Рис. 3. Микроскопическая и иммуногистохимическая характеристика периферических отделов узлов эпителиоидной гемангиоэндотелиомы легких.

а — капилляры и многочисленные эпителиоидные клетки, фибробласты, макрофаги и другие клетки в периферической зоне узелка в легких, окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; б — ИГХ-реакция с антителами к CD31, $\times 120$; в — ИГХ-реакция с антителами к CD34, $\times 120$; г — ИГХ-реакция с антителами к белку ERG, $\times 240$.

Fig. 3. Microscopic and immunohistochemical characteristics of the peripheral parts of the epithelioid hemangioendothelioma nodules.

а — capillaries, numerous epithelioid cells, fibroblasts, macrophages and other cells in the peripheral zone of the nodule, H&E, $\times 400$; б — IHC reaction with anti-CD31 antibodies, $\times 120$; в — IHC reaction with anti-CD34 antibodies, $\times 120$; д — IHC reaction with anti-ERG protein antibodies, $\times 240$.

Установление гистогенеза опухоли — одна из труднейших задач онкоморфологии, а та легкость, с которой она обычно решается в современной литературе, обусловлена смешением двух принципиально разных понятий — гистологии опухоли и ее гистогенеза, их ничуть не оправданным отождествлением, что неоднократно подчеркивалось М.Ф. Глазуновым [19], Д.И. Головиным [20] и другими авторитетными отечественными онкоморфологами. В анализе гистогенеза опухоли установление морфологического сходства ее клеток с клетками известной гистологической природы — это всего лишь лицевая сторона медали, а ее оборотной стороной является решение вопроса об истоках роста новообразования — о его зачатке (дисгенетическом или пролиферационном) и о тех условиях, в которых он, раз возникнув, получил стимул к росту и развитию.

Иначе говоря, проблема гистогенеза новообразования неотделима от его патогенеза, который определяется рядом факторов, лежащих вне новообразования как такового. Анализу подлежит вся совокупность клиничко-анатомических данных, а не только результаты микроскопического исследования, пусть и с использованием электронно-микроскопических, гисто- и иммуногистохимических методов. Очевидно, экспрессия тех или иных биомаркеров дает возможность судить о тканевой природе и степени диффе-

ренцировки клеточных элементов новообразования наряду с его пролиферационным потенциалом исключительно в данный момент, но не о динамике, как это требуется для суждения о гистогенезе.

Сопоставляя гистологические и гистогенетические особенности эндотелиом, В. Fischer-Wasels [21] отмечал, что по логическим и гистологическим основаниям понятие «эндотелиома» должно быть отклонено, а диагноз с использованием термина «эндотелиома» является «диагнозом незнания» (Verlegenheitsdiagnose).

Гистологические критерии эндотелиомы неоднозначны. Во всех обзорах ЭГЭ непременно указывается, что речь идет о пролиферации эпителиоидных клеток при значительных колебаниях их величины и формы, о переходах клеток в уплощенные формы, лишь только они оказываются выстилкой какой-либо полости или щели. По всей вероятности, такой полиморфизм есть следствие гистогенетической неоднородности ЭГЭ, нарушающей примитивную гистологическую схему ее гистогенеза, которую подтверждает уже то, что в разных участках одна и та же опухоль имеет различное строение, как это следует из наших наблюдений, при этом бесклеточный склероз в центральной зоне узла сочетается с обилием клеток на его периферии.

По мнению В. Fischer-Wasels [21], в истинных эндотелиомах кровеносных и лимфатических сосудов опухолевые

клетки сохраняют способность к выстилке полостей постоянно, с самого начала и до конца своего роста. Поскольку эта способность в динамике роста утрачивается, вся специфичность эндотелиомы теряется.

В наших случаях, как и в наблюдениях, описанных в литературе, рост ЭГЭ завершался необратимым склерозированием, исключая прогрессирующий рост «опухоли» на протяжении многих лет. Надо полагать, что ЭГЭ до сих пор описывается как злокачественная опухоль только по традиции, подобно любому иному узловатому длительно прогрессирующему разрастанию клеток, возникающему как бы беспричинно и не укладываемому в рамки процессов реактивного роста.

В заключение зададимся вопросом, насколько правомочно считать ЭГЭ опухолью, а точнее говоря, опухолью истинной, не обладающей ни местными деструктивными свойствами, ни способностью к метастазированию?

В Международной классификации опухолей [18] ЭГЭ рассматривается как злокачественная опухоль grade 1 или grade 2. Такой подход к понятию «доброкачественная опухоль» вполне оправдан с точки зрения клинициста, учитывающего клиническое течение и операбельность того или иного новообразования. С биологической точки зрения, необходимо сузить понятие «злокачественная опухоль», выделив из него процессы пролиферации иной природы, протекающие то в узловой форме, то в диффузной.

М.Ф. Глазунов писал: «Необходимо договориться раз и навсегда, что ни анатомическая форма роста, ни характер взаимоотношения растущей ткани с ее окружением (капсула, экспансивный или инфильтрирующий рост) сами по себе не могут говорить ни за, ни против опухолевой природы новообразовательного процесса» [19].

Истинная опухоль, согласно определению, — новообразование с неактивным беспредельным типом роста, причем именно беспредельным, а не длительным (или, по терминологии Н.Н. Петрова, «без определенного заканчивания») и в то же время таким, при котором отсутствует дифференцировка новообразования в целом, что и является необходимым и достаточным морфологическим признаком беспредельного роста [19].

ЭГЭ этому определению не удовлетворяет. Ее эпителиоидные клетки с иммуногистохимическими атрибутами эндотелиальных клеток и невысоким пролиферационным потенциалом разрастаются в окружающей ткани в виде опу-

холевидных узлов различных размеров в определенных пределах на протяжении многих лет. Способности к автономному безудержному росту они лишены, и пролиферация эндотелиоцитов закономерно завершается склерозированием.

Клинико-морфологические особенности ЭГЭ ставят вопрос о сущности пролиферации эндотелиоцитов с формированием опухолевидных узлов. Согласно нашим наблюдениям, ЭГЭ выявляются у больных женского пола в тот возрастной период, когда с большой вероятностью следует ожидать развитие тех или иных гормональных расстройств. Можно высказать предположение, что ЭГЭ является псевдоопухолью и ее можно рассматривать наряду с миомой матки, фиброаденомой молочной железы и другими в нозологической группе дисгормональной гиперплазии, как это предложили мы в отношении доброкачественной лейомиомы матки с поражением легких [22].

В отличие от этих новообразований причина, способствующая пролиферации эндотелиоцитов в легких, у больных с ЭГЭ остается пока еще загадкой и требует специального целенаправленного изучения как в клинике, так и при патолого-анатомическом исследовании. Вероятно, речь идет о тех или иных нейроэндокринных стимулах, роль которых в определенных патологических ситуациях раскрыта М.А. Пальцевым и И.М. Кветным [23], однако в случае ЭГЭ не получила пока еще должной оценки.

Выводы

1. ЭГЭ является, согласно нашим наблюдениям, доброкачественным новообразованием с тенденцией к стабилизации роста, морфологическим признаком чего служит развитие распространенных склеротических изменений.

2. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование подтверждает, что ЭГЭ состоит из эндотелиоцитов без атипии и с незначительным пролиферационным потенциалом.

3. Вопрос о биологической природе ЭГЭ требует дальнейшего исследования. Есть все основания рассматривать ЭГЭ как псевдоопухоль типа нодозной дисгормональной гиперплазии, подобно доброкачественной лейомиоме матки с поражением легких.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Должанский О.В., Пальцева Е.М., Морозова М.М., Базаров Д.В., Боранов Э.В., Федоров Д.Н. Солитарная эпителиоидная гемангиоэндотелиома в сочетании с нодулярным паренхиматозным амилоидозом легкого и болезнью Розай—Дорфмана. *Архив патологии*. 2018;80(2):52-59. Dolzhanskii OV, Pal'tseva EM, Morozova MM, Bazarov DV, Boranov EV, Fedorov DN. Solitary epithelioid hemangioendothelioma concurrent with nodular parenchymal amyloidosis of the lung and Rosai—Dorfman disease. *Arkhiv Patologii*. 2018;80(2):52-59. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol201880252-59>
2. Cousin S, Le Leorier F, Crombé A, Karanian M, Minard-Colin V, Penel N. Hémangioendothéliome épithélioïde. *Bull Cancer*. 2019;106:73-83. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.11.004>
3. Deyrup AT, Tighiouart M, Montag AG, Weiss SW. Epithelioid hemangioendothelioma of soft tissue: a proposal for risk stratification based on 49 cases. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(6):924-927. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e31815bf8e6>
4. Sardaro A, Bardoscia L, Petruzzelli MF, Portaluri M. Epithelioid hemangioendothelioma: an overview and update on a rare vascular tumor. *Oncol Rev*. 2014;8(2):259. <https://doi.org/10.4081/oncol.2014.259>
5. Dail DH, Liebow AA. Intravascular bronchioloalveolar tumor. *Am J Pathol*. 1975;78:6-7.
6. Weiss SW, Enzinger FM. Epithelioid hemangioendothelioma: a vascular tumor often mistaken for carcinoma. *Cancer*. 1982;50(5):970-981.
7. Казак Т.И., Альтман Э.И., Гринберг Л.М., Трегубов Е.С. Гигалинизирующая внутрисосудистая «бронхиолоальвеолярная» опухоль. *Архив патологии*. 1986;48(7):57-59.

- Kazak TI, Al'tman EI, Grinberg LM, Tregubov ES. Gialiniziruyuschaya vnutrisosudistaya «bronkhioloal'veolyarnaya» opukhol'. *Arkhiv Patologii*. 1986;48(7):57-59. (In Russ.).
8. Двораковская И.В., Грозов Р.В. Эпителиоидная гемангиоэпителиома легких. *Вопросы онкологии*. 2007;33(5):598-600. Dvorakovskaya IV, Grozov RV. Epitelioidnaya gemangioepitelioma legkikh. *Problems in Oncology=Voprosy onkologii*. 2007;33(5):598-600. (In Russ.).
 9. Павлов К.А., Дубова Е.А., Шеголеву А.И., Пикунов М.Ю. Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легких. *Пульмонология*. 2007;3:122-125. Pavlov KA, Dubova EA, Shchegolev AI, Pikunov MYu. Pulmonary epithelioid hemangioepithelioma. *Russian Pulmonology Journal=Pul'monologiya*. 2007;(3):122-125. (In Russ.).
 10. Непомнящая Е.М., Зинькович С.А., Попович О.А. Склерозирующая гемангиома легкого. *Известия высших учебных заведений. Северо-кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2007;1:104-105. Nepomnyashchaya EM, Zinkovich SA, Popovich OA. Skleroziruyuschaya gemangioma legkogo. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-kavkazskii region. Seriya: Estestennyye nauki*. 2007;(1):104-105. (In Russ.).
 11. Мухина М.С., Максимова Н.А., Тарасова М.В., Левченко Е.В., Кулакова Ю.А., Романчишен А.Ф. Эпителиоидная гемангиоэндотелиома легкого. *Архив патологии*. 2009;71(6):39-41. Mukhina MS, Maksimova NA, Tarasova MV, Levchenko EV, Kulakova YuA, Romanchishen AF. Epitelioidnaya gemangioendotelioma legkogo. *Arkhiv Patologii*. 2009;71(6):39-41. (In Russ.).
 12. Кислицына Л.Ю., Батокоев Ю.Н., Тараненко А.В., Улыбин П.С. Склерозирующая гемангиома легких. Клинический случай с интраоперационной морфологической диагностикой. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011;105(6):283-285. Kislicina LYu, Batokoev YuN, Taranenko AV, Ulybin PS. Skleroziruyuschaya gemangioma legkih. Klinicheskii sluchai s intraoperacionnoi morfologicheskoi diagnostikoi. *Siberian Scientific Medical Journal=Sibirskii meditsinskii Zhurnal (Irkutsk)*. 2011;105(6):283-285. (In Russ.).
 13. Amin RMS, Hiroshima K, Kokubo T, Nishikawa M, Narita M, Kurok Mi, Nakatan Y. Risk factors and independent predictors of survival in patients with pulmonary epithelioid haemangioendothelioma. Review of the literature and a case report. *Respirology*. 2006;11(6):818-825. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00923.x>
 14. Rosenberg A, Agulnik M. Epithelioid hemangioendothelioma: update on diagnosis and treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2018; 19(4):19. <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0536-y>
 15. Tanas MR, Sboner A, Oliveira AM, Erickson-Johnson MR, Hespelt J, Hanwrigh, PJ, Rubin BP, et al. Identification of a disease-defining gene fusion in epithelioid hemangioendothelioma. *Sci Transl Med*. 2011;3(98):98ra82. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002409>
 16. Tsarouhaa Haroula, Kyriazogloub AI, Ribeiroc FR, Teixeira MR, Agnantisd N, Pandis N. Chromosome analysis and molecular cytogenetic investigations of an epithelioid hemangioendothelioma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169(2):164-168. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2006.03.018>
 17. Stacchiotti S, Miah AB, Frezza AM, Messiou C, Morosi C, Caraceni A, Antonescu CR, Bajpai J, Baldini E, Bauer S, et al. Epithelioid hemangioendothelioma, an ultra-rare cancer: a consensus paper from the community of experts. *ESMO Open*. 2021;6(3):100170. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100170>
 18. World Health Organization classification of tumour's: Pathology & genetics. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC; 2004.
 19. Глазунов М.Ф. Общая морфология опухолей. В кн.: *Злокачественные опухоли*. Л.: МЕДГИЗ; 1947;1:109-126. Glazunov MF. Obschaya morfologiya opukholei. In: *Zlokachestvennyye opukholi*. Leningrad: MEDGIZ; 1947;1:109-126. (In Russ.).
 20. Головин Д.И. *Атлас опухолей человека*. Л.: Медицина; 1975. Golovin DI. *Atlas opukholei cheloveka*. Leningrad: Meditsina; 1975. (In Russ.).
 21. Fischer-Wasels B. Allgemeine Geschwulstlehre. In: *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1927;1341-790.
 22. Двораковская И.В., Ильин А.А., Дзадзуа Д.В., Ариэль Б.М., Дворецкий С.Ю., Акопов А.Л. Доброкачественная лейомиома матки с поражением легких. *Вопросы онкологии*. 2021;67(5):707-712. Dvorakovskaya IV, Il'in AA, Dzadzua DV, Ariel' BM, Dvoretckii SYu, Akopov AL. Benign uterine leiomyoma with lung lesions. *Problems in Oncology=Voprosy onkologii*. 2021;67(5):707-712. (In Russ.).
 23. Пальцев М.А., Кветной И.М. *Руководство по нейроиммуноэндокринологии*. М.: Шико; 2014. Pal'tsev MA, Kvetnoi IM. *Guide to neuroimmunoenocrinology*. Moscow: Shiko; 2014. (In Russ.).

Поступила 27.11.2021

Received 27.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Феномен псевдотуморозной перекрестной иммуногистохимической реактивности глии при прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии

© О.М. ВОРОБЬЕВА¹, Д.А. СИТОВСКАЯ¹, К.К. КУКАНОВ¹, В.Н. ЭЛЛИНИДИ², И.А. САМУСЕНКО², Н.М. КАЛИНИНА², Ю.М. ЗАБРОДСКАЯ¹⁻³

¹Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия (ПМЛ) — подострое демиелинизирующее поражение головного мозга, вызванное инфицированием олигодендроцитов и астроцитов литическим вирусом JC на фоне иммуносупрессии. Представлено наблюдение ПМЛ с опухолеподобным течением. При морфологической диагностике выявлено неспецифическое окрашивание антителами к Ki-67, p53, IDH1, NF и Vim в ядрах глиоцитов, пораженных JC-вирусом. Гистологическое исследование и микроскопическая оценка изменений головного мозга для постановки диагноза ПМЛ являются приоритетными. Рекомендуемая прижизненная биопсия не всегда помогает в четкой верификации ПМЛ в связи с ограниченным объемом тканевых фрагментов, представляемых для исследования. Для корректной интерпретации изменений при прижизненном патолого-анатомическом исследовании и верификации ПМЛ важно забирать материал во время стереотаксической биопсии не только из центра, но и из краев измененных тканей и перифокальной зоны для возможности пространственной гистологической оценки патологического процесса.

Ключевые слова: прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, псевдотумор, Ki-67, p53, перекрестная иммунореактивность, стереотаксическая биопсия, иммуногистохимия.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Воробьева О.М. — <https://orcid.org/0000-0002-1349-7349>

Ситовская Д.А. — <https://orcid.org/0000-0001-9721-3827>

Куканов К.К. — <https://orcid.org/0000-0002-1123-8271>

Эллиниди В.Н. — <https://orcid.org/0000-0002-7091-3142>

Самусенко И.А. — <https://orcid.org/0000-0003-0622-3515>

Калинина Н.М. — <https://orcid.org/0000-0002-4357-1212>

Забродская Ю.М. — <https://orcid.org/0000-0001-6206-2133>

Автор, ответственный за переписку: Воробьева О.М. — e-mail: vorobeva_om@almazovcentre.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Воробьева О.М., Ситовская Д.А., Куканов К.К., Эллиниди В.Н., Самусенко И.А., Калинина Н.М., Забродская Ю.М. Феномен псевдотуморозной перекрестной иммуногистохимической реактивности глии при прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии. *Архив патологии*. 2022;84(2):36–43. <https://doi.org/10.17116/patol20228402136>

The phenomenon of pseudotumorous cross immunohistochemical reactivity of glia in progressive multifocal leukoencephalopathy

© O.M. VOROBEVA¹, D.A. SITOVSKAYA¹, K.K. KUKANOV¹, V.N. ELLINIDI², I.A. SAMUSENKO², N.M. KALININA², YU.M. ZABRODSKAYA¹⁻³

¹Polenov Neurosurgical Institute — the branch of Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia;

²The Federal State budgetary institute «the Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine», St. Petersburg, Russia;

³S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

ABSTRACT

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a subacute demyelinating brain damage caused by infection of oligodendrocytes and astrocytes with the lytic JC virus on the background of immunosuppression. A case report of PML with a tumor-like course is presented. Morphological diagnostics revealed non-specific staining of antibodies to Ki-67, p53, IDH1, NF and Vim in the nuclei of gliocytes affected by the JC virus. Histological examination and microscopic evaluation of the changes in the brain for the diagnosis of PML is a priority. The recommended intravital biopsy does not always help in clear verification of PML due to the limited volume of tissue fragments presented for research. For the correct interpretation of changes during an intravital pathological examination and verification of PML, it is important to take material during a stereotaxic biopsy, not only

from the center, but from the edges and perifocal zone of the altered tissues for the possibility of a spatial histological assessment of the pathological process.

Keywords: progressive multifocal leukoencephalopathy, PML, pseudotumor, Ki-67, p53, cross-reactivity, stereotaxic biopsy, immunohistochemistry.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Vorobeva O.M. — <https://orcid.org/0000-0002-1349-7349>

Sitovskaya D.A. — <https://orcid.org/0000-0001-9721-3827>

Kukanov K.K. — <https://orcid.org/0000-0002-1123-8271>

Ellinidi V.N. — <https://orcid.org/0000-0002-7091-3142>

Samusenko I.A. — <https://orcid.org/0000-0003-0622-3515>

Kalinina N.M. — <https://orcid.org/0000-0002-4357-1212>

Zabrodsкая Yu.M. — <https://orcid.org/0000-0001-6206-2133>

Corresponding author: Vorobeva O.M. — e-mail: vorobeva_om@almazovcentre.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Vorobeva OM, Sitovskaya DA, Kukanov KK, Ellinidi VN, Samusenko IA, Kalinina NM, Zabrodsкая YuM. The phenomenon of pseudotumorous cross immunohistochemical reactivity of glia in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):36–43. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/ptol20228402136>

Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия (ПМЛ) — это подострое демиелинизирующее заболевание головного мозга, вызванное инфицированием олигодендроцитов и астроцитов литическим вирусом JC (JCV, John Cunningham virus). JC — это инициалы первого пациента — John Cunningham, у которого был обнаружен вирус. JCV — широко распространенный полиомавирус человека, носителями которого являются 50–90% населения [1, 2]. ПМЛ была впервые описана К. Astrom и соавт. [3] у трех пациентов с болезнью Ходжкина в 1958 г.

Инфицирование JCV происходит в детстве с развитием латентной инфекции у здоровых людей. Репликация нейротропного штамма JCV в глиальных клетках вызывает фатальное демиелинизирующее заболевание ЦНС, проявляющееся необратимой ПМЛ. Этиологической терапии ПМЛ на данный момент не существует. Описаны случаи длительного течения ПМЛ с утиханием активности процесса без признаков вирусной реактивации и репликации [4].

ПМЛ развивается у людей с иммуносупрессивными состояниями. Активации вируса в организме человека предшествует значительная супрессия иммунной системы — в подавляющем большинстве случаев ПМЛ является проявлением синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Реже заболевание развивается после иммуносупрессивной и иммуномодуляторной терапии, например, лечения natalizумабом рассеянного склероза более 3 лет, после трансплантации органов, при ревматических болезнях, а также гематологических новообразованиях, таких как болезнь Ходжкина, хронический лимфолейкоз [5]. Во время магнитно-резонансной томографии (МРТ) выявляется мультифокальное поражение подкоркового белого вещества, полушарий и/или ножек мозжечка. Клиническое течение характеризуется подострым прогрессирующим с неблагоприятным прогнозом. При отсутствии лечения 20–50% пациентов умирают в течение 3 мес [6].

Патоморфологические проявления ПМЛ имеют характерную картину вирусного повреждения мозга. При гистологическом исследовании в инфицированных олигодендроглиоцитах регистрируются вирусные ядерные включения или центральное просветление нуклеоплазмы с оттеснением к краю хроматина; очаги демиелинизации, связанные с потерей олигодендроглиоцитов; аксональные поврежде-

ния с разрушением на поздних стадиях; макрофаги в участках разрушения миелина; слабая воспалительная реакция лимфоцитарного характера на фоне иммуносупрессии; «причудливые» крупные реактивные астроциты с неправильными ядрами, в том числе многоядерные [7].

Несмотря на четко обозначенные клинико-патоморфологические и инструментальные диагностические критерии, нередко вызывает сложность верификации ПМЛ при жизни пациента. Для исключения ПМЛ проводится дифференциальная диагностика между новообразованием, рассеянным склерозом, некротическими энцефалитами, в том числе вызванными Varicella-zoster virus и токсоплазмой, инфарктом. Рекомендуемая диагностическая биопсия не всегда помогает четкой верификации ПМЛ в связи с полиморфными проявлениями и стадийностью процесса, а также наличием перекрестной реакции пораженных вирусом клеток при иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании.

Представляем собственное клиническое наблюдение сложной прижизненной гистологической верификации ПМЛ.

Пациент Н., 70 лет, в течение полугода стал замечать постепенное нарастание слабости в левой кисти, которая впоследствии распространилась на предплечье и плечо. С этими жалобами он обратился к неврологу в Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова, где при осмотре были диагностированы парез в левой руке до 2–3 баллов, сглаженность левой носогубной складки, синдром игнорирования левого пространства, дизартричная речь, в связи с чем был госпитализирован в клинику МЧС России им. А.М. Никифорова с диагнозом: «Острое нарушение мозгового кровообращения в бассейне правой средней мозговой артерии, острый период». На момент осмотра предъявлял жалобы на снижение силы в правых конечностях, невозможность самостоятельно передвигаться, нарушение речи (забывал слова), ухудшение зрения. Сбор жалоб и анамнеза был затруднен: пациент не мог четко сформулировать свои жалобы, вспомнить хронологию развития событий.

При МРТ выявлена картина множественных супратенториальных патологических образований неоднородной структуры с относительно четкими контурами: в правой теменной доле, в задних отделах левой височной доли,

в проекции субкортикальных отделов правой затылочной доли, стыка левой теменной и затылочной долей. При трактовке данной МРТ-картины предложен дифференциальный диагноз между первичным новообразованием, вторичным поражением (метастазом), аутоиммунным воспалительным и специфическим инфекционным процессом. Через 1 мес при позитронно-эмиссионной (ПЭТ)/компьютерной томографии (КТ) головного мозга с ^{11}C -метионином выявлено многоочаговое поражение больших полушарий головного мозга с умеренной метаболической активностью (индекс накопления радиофармпрепарата 2.34), данная ПЭТ-картина в совокупности с результатами МРТ была расценена как возможный аутоиммунный васкулит ЦНС с добавлением в дифференциальный ряд интраваскулярной лимфомы. Пациенту произведена стереотаксическая биопсия патологически измененных структур головного мозга в правой теменной доли.

При гистологическом исследовании в 5 очень маленьких кусочках выявлены разрастания крупных уродливых клеток астроцитарного вида с вакуолизированной и зернистой цитоплазмой, выраженными грубыми отростками, крупным ядром с выраженным ядрышком, некоторые ядра вакуолизированы, встречались двухядерные клетки. Отмечались обильная инфильтрация макрофагами с пенистой цитоплазмой, очаговая лимфоцитозитарная инфильтрация; гиперплазия сосудов с пролиферацией эндотелия, участками с выраженными периваскулярными лимфоидными муфтами; единичные эозинофильные тельца, апоптотические изменения, единичные митозы. В 2 кусочках вещество мозга с отеком, гиперплазией глии, со слабой лимфоидной инфильтрацией. При ИГХ-исследовании с маркерами к глиальному фибриллярному белку (GFAP), нейронспецифической энolahе (NSE), S100 выявлено цитоплазматическое окрашивание крупных клеток астроцитарного вида. Воспалительный инфильтрат имел преимущественно CD3-положительную экспрессию, единичные клетки позитивны к CD20. Экспрессия синаптофизина выявлялась в цитоплазме некоторых крупных клеток. Ядерный маркер Ki-67 выявлялся в 5–8% клеток.

Морфологическая картина с наличием атипических клеток, высокой пролиферативной активности в совокупности с клиническими и данными МРТ расценена как опухолевый процесс, более характерный для анапластической ганглиоглиомы, ассоциированной с продуктивным вирусным энцефалитом, grade III.

Проведен курс терапии метилпреднизолоном в дозе 1 г внутривенно 5 раз с последующим переходом на пероральный прием и отменой; плазмаферез 4 раза с положительной динамикой в виде уменьшения левостороннего гемипареза. При пересмотре препаратов и коллегиальном обсуждении специалистами, учитывая клиническое течение, многоочаговый характер поражения, был предложен дифференциальный ряд, включающий в себя воспалительный процесс и дебют демиелинизирующего заболевания. С помощью ПЦР-исследования крови и ликвора были исключены ВИЧ-инфекция, боррелиоз, токсоплазмоз и поражения, вызванные вирусами герпеса и клещевого энцефалита. В общем анализе ликвора существенных отклонений по белково-клеточному составу не выявлено.

Проведенные иммунологические исследования выявили иммунодефицит с преимущественным дефектом антител: в субпопуляционном составе, с одной стороны, резко снижено число натуральных киллеров до 4%, что могло трактоваться как иммунодефицит, и, с другой стороны, —

можно предположить миграцию этих клеток в орган-мишень; было существенно увеличено число В-лимфоцитов, несущих на своей поверхности HLA-DR до 55%, при референсных (см. везде) значениях не более 6–22%; увеличена часть Т-клеток (до 13,1%, при референсных значениях до 10%) и NK-клеток (до 4,6%, при референсных значениях до 1,8%), несущих маркер поздней активации HLA-DR. Необычным являлось увеличение доли В-клеток более чем в 2 раза по сравнению с референсными значениями. При этом продукция иммуноглобулинов А, М, G — конечного этапа дифференцировки В-клеток — была резко снижена. Полученные результаты требовали исследования уровня В-лимфоцитов и иммуноглобулинов в динамике для исключения первичного иммунодефицита взрослых, который может манифестировать в позднем возрасте. Расширенное иммунологическое обследование, которое выявило резкое снижение продукции иммуноглобулинов А, М, G при сохранности общего числа В-лимфоцитов и даже увеличении доли В-лимфоцитов до 41%, при референсных значениях не более 6–18%. Проведенное через 1 мес повторное исследование уровня иммуноглобулинов и В-лимфоцитов выявило повышение относительного числа В-клеток до 46% и такое же низкое количество продуцируемых IgA — 0,48–0,56 при референсных значениях 0,9–4,5, IgM 0,25 и менее при референсных значениях 0,6–2,5 и IgG 2,88–3,01 при референсных значениях 8–18. Определение В-клеток памяти и аутореактивных В-лимфоцитов (в том числе аутореактивных В-клеток памяти) также не внесло ясности в понимание причин снижения продукции иммуноглобулинов. Были снижены все виды В-клеток памяти. Тем не менее клинически наличие иммунодефицита не исключено ввиду повторных инфекций.

Повторное исследование полученного ранее гистологического материала методом ПЦР не выявило ДНК вируса Эпштейна—Барр, вируса герпеса 6-го типа и цитомегаловируса.

В течение 2 мес наблюдалось прогрессирующее ухудшение состояния пациента в виде нарастания мышечной слабости в левых конечностях, появилась спастичность в левой руке, пациент перестал самостоятельно себя обслуживать (по шкале Карновского 50 баллов). В результате проведения нескольких контрольных МРТ головного мозга (рис. 1) в конвекситальных отделах правой теменной доли (субкортикально) выявлялось патологическое образование неоднородной структуры с относительно четкими контурами, окруженное ободком гемосидерина по латеральной поверхности размером 10,1×14,5×11,5 мм, не накапливающее контрастное вещество, перифокальный отек умерено выражен. В задних отделах левой височной доли (субкортикально) определялась зона гиперинтенсивного на T2 ВИ-сигнала (слабогипоинтенсивного на T1 ВИ) с относительно четкими контурами, не накапливавшая контрастное вещество, размером 21,6×9,7 мм; аналогичная зона изменений находилась в проекции субкортикальных отделов правой затылочной доли размером 16×14,3 мм, в субкортикальных отделах правой теменной доли размером 9,6×7,1 мм, в проекции стыка левой теменной и затылочной долей (субкортикально) размером 30×18,5 мм.

С диагнозом «множественные (правая лобная, теменная и затылочная доли, левые теменная и затылочная доли) очаговые образования головного мозга (анапластическая ганглиоглиома (?)) ассоциированная с продуктивным вирусным энцефалитом) с развитием неврологической симптоматики в виде спастического левостороннего гемипареза,

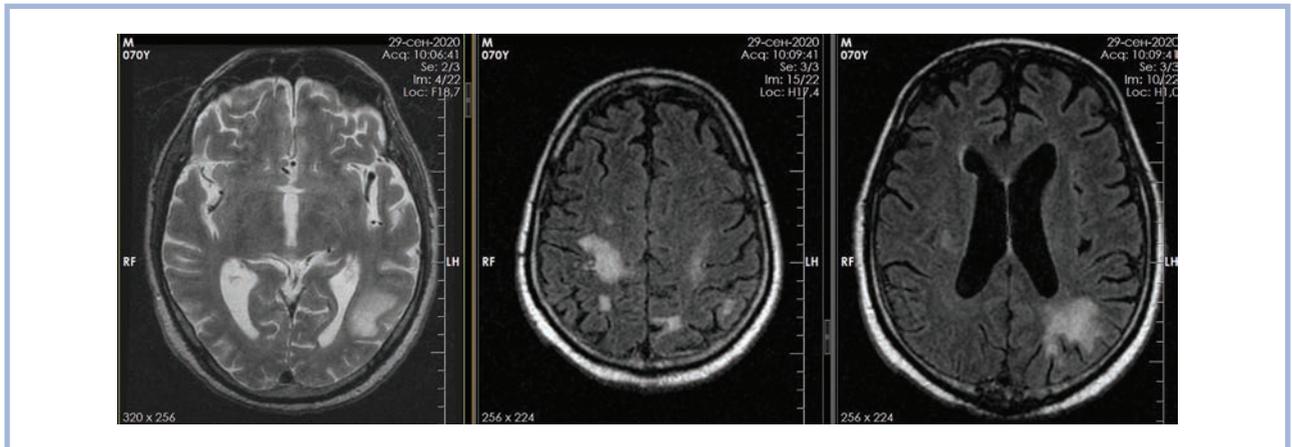


Рис. 1. T2-взвешенные постконтрастные магнитно-резонансные томограммы, выполненные в аксиальной проекции. Картина спустя 2 мес после проведения первой стереотаксической биопсии.

а — в задних отделах левой височной доли (субкортикально) выявляется зона гиперинтенсивного сигнала с относительно четкими контурами, не накапливающая контрастное вещество; б — множественные патологические образования неоднородной структуры с относительно четкими контурами, не накапливающие контрастное вещество, перифокальный отек умеренно выражен; в — в области заднего рога левого бокового желудочка зона гиперинтенсивного сигнала с относительно четкими контурами, не накапливающая контрастное вещество.

Fig. 1. T2 weighted, post-contrast MRI scans, performed in axial projections, 2 months after the first stereotaxic biopsy.

a — zone of hyperintense signal with relatively clear contours, which does not accumulate contrast agent in the posterior parts of the left temporal lobe (subcortical); b — multiple pathological formations of a heterogeneous structure with relatively clear contours, does not accumulate contrast agent, perifocal edema is moderate; c — in the region of the posterior horn of the left lateral ventricle, there is a zone of hyperintense signal with relatively clear contours that does not accumulate contrast agent.

дистонического и дискоординационного, судорожного синдромов» больной поступил в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова.

Неврологический осмотр. Состояние больного на момент осмотра стабильное, компенсированное по витальным функциям. Сознание ясное. На вопросы старается отвечать правильно, забывает слова, даты, названия. Критика несколько снижена. Оценка по шкале Карновского 50 баллов.

Зрачки D=S, реакция на свет снижена. Движения глазных яблок: за молоточком не следит, при просьбе посмотреть в стороны движения вправо, вверх и вниз сохранены, влево не смотрит (игнорирует левое пространство). Оценка полей зрения затруднена (больной не понимает задание). Чувствительность на лице не нарушена. Отмечается сглаженность левой носогубной складки. Слух, со слов пациента, сохранен с двух сторон. Глотание, фонация не нарушены. Язык по средней линии. Спастический гемипарез в левых конечностях до плечей в левой руке, 2 баллов в левой ноге. Тонус в правых конечностях слегка повышен. Глубокие рефлексы живые, D<S. Двусторонние патологические знаки. Болевая чувствительность не нарушена. Координаторные пробы правыми конечностями выполняет удовлетворительно, левыми не выполняет из-за гемипареза. Менингеальных симптомов не выявлено.

С целью дифференциальной диагностики и верификации патологического процесса принято решение о повторной стереотаксической биопсии для получения более информативного материала.

Перед проведением биопсии за 10 дней были отменены глюкокортикостероиды. На навигационной станции CRW Radionix проведены расчеты целевой точки и траектории доступа к ней, по полученным координатам собрана стереотаксическая рама. Выполнен разрез в проекции запланированной точки доступа в височной области

слева. Наложено фрезевое отверстие. Биопсийной иглой через точечный разрез в твердой мозговой оболочке произведен забор материала в цели-мишени (3 фрагмента) на 1 см выше — край новообразования и на 2 см выше — перифокальная зона.

Результат гистологического исследования повторной стереотаксической биопсии. При срочном интраоперационном гистологическом исследовании выявлена ткань мозга с макрофагами и клетками, подозрительными на атипичские, и периваскулярными лимфоидными муфтами (рис. 2).

При гистологическом исследовании фиксированного материала (рис. 3) (20 мелких кусочков) обнаружены фрагменты вещества мозга с фокусами демиелинизации разной степени выраженности вплоть до формирования некрозов, фокусами массивной макрофагальной инфильтрации, в цитоплазме которых ШИК-позитивные продукты распада миелина. Большое количество олигодендроглиоцитов с круглыми «лаковыми» ядрами, в части ядер — эозинофильные округлые вирусные включения; скопления крупных отростчатых астроцитов с обильной цитоплазмой и большими круглыми ядрами с мелкозернистым распределением хроматина, диффузно-расположенные уродливые гигантские астроциты с причудливыми ядрами, в части ядер также эозинофильные вирусные включения; сосуды с реактивным набухшим эндотелием со слабой периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией.

При ИГХ-исследовании (с положительным и отрицательным контролем) обнаружено положительное цитоплазматическое окрашивание клеток GFAP и виментина (Vim). При окрашивании синаптофизинном выявлено мелкогранулярное окрашивание коры. ИГХ-реакция на нейрофиламенты (NF) показала нарушение гистоархитектоники аксонов в виде фокальных булавовидных утолщений (аксонопатия), а также признаки отека и потери части аксонов.

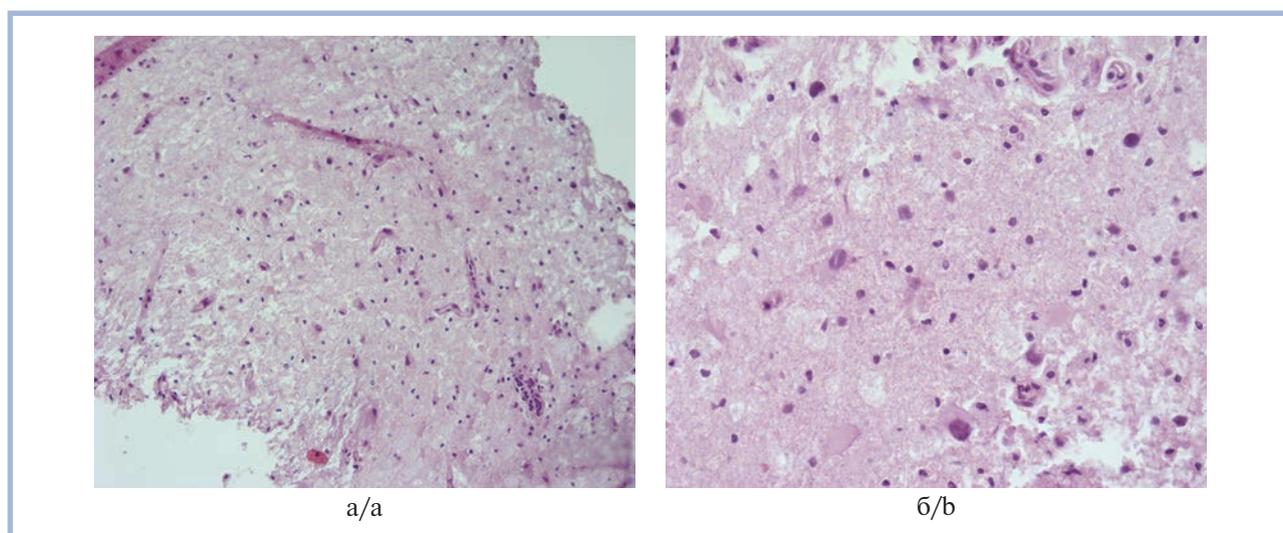


Рис. 2. Срочное интраоперационное исследование.

а — ангиоматоз с периваскулярными лимфоидными муфтами, крупные астроциты, $\times 200$; б — крупные полиморфные причудливые астроциты, гиперхроматоз ядер; замороженные срезы, $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Morphological picture obtained during urgent intraoperative study with stereotaxic biopsy.

а — angiomatosis with perivascular lymphoid couplings, large astrocytes, $\times 200$; б — large polymorphic bizarre astrocytes, nuclear hyperchromatosis. $\times 400$. H&E.

Воспалительный инфильтрат представлен CD45- и CD3-позитивными лимфоцитами и CD68-позитивными макрофагами, CD20-позитивных клеток обнаружено не было. В клетках патологического образования имелось выраженное ядерное окрашивание Ki-67, p53, NF, IDH1r132h и Vim.

В результате клинко-морфологического сопоставления верифицирована ПМЛ с признаками текущего вирусного энцефалита с резко выраженной реакцией разных популяций клеток глии. Ядерная экспрессия опухолевых маркеров и Ki-67 интерпретирована как ложноположительная в связи с антигенным изменением ядер, пораженных JC-вирусом.

Обсуждение

Перекрестная реактивность в иммуногистохимии — хорошо известное явление с важными последствиями для патологов представляет собой важный потенциальный источник диагностических ошибок. Перекрестное окрашивание происходит из-за связывания антител с аналогичными пептидными последовательностями в белках, отличных от иммуногена [8]. При некоторых обстоятельствах такой феномен может использоваться в диагностических целях, например, цитоплазматическая экспрессия WT1 при сосудистых поражениях [9]. М. Jaconi и соавт. [10] обнаружили перекрестную реакцию антитела TdT в герминоклеточных опухолях. В случаях гиалинизирующей трабекулярной опухоли щитовидной железы экспрессия Ki-67 приобретает мембранную локализацию, что помогает в дифференциальной диагностике с папиллярными карциномами щитовидной железы [9]. Другая опухоль, которая, как было описано, демонстрирует мембранное (и цитоплазматическое) окрашивание (см. выше и ниже) на Ki-67 в отличие от рака легких, — это склерозирующая гемангиома легких [11, 12].

Происхождение мембранного окрашивания антителом Ki-67 остается неясным. М. Hirokawa и соавт., Е. Leonardo

и соавт. считают, что такое выраженное и специфическое для определенных нозологических единиц мембранное окрашивание Ki-67 не является артефактом и может быть объяснено феноменом перекрестной реактивности [9, 11, 13]. D. Faratian и соавт. [14] предположили, что такое окрашивание Ki-67 может быть обусловлено функциональной транслокацией антигена или его части.

В представленном наблюдении ПМЛ в глиальных клетках наблюдалось выраженное ядерное окрашивание Ki-67, p53, NF, IDH1r132h и Vim. При том что ядерное окрашивание не является характерным для таких антител, как IDH1r132h, NF и Vim. Также следует подчеркнуть, что процент позитивных клеток к Ki-67 и p53 может быть довольно высоким, особенно если говорить о значениях при нейроонкологических заболеваниях. При ПМЛ экспрессия Ki-67 и p53 может быть обнаружена в клетках, пораженных вирусом [15]. В статье К.С. Santa Cruz и соавт. [4] описывают при ПМЛ ядерную экспрессию p53 в причудливых глиальных клетках.

S. Saribas и соавт. [16] описали взаимодействие Sm t-Ag с p53, важным белком-супрессором опухоли, на который обычно нацелены LT-Ag полиомавируса и различные другие вирусные онкогенные белки. Эти протеомные данные также показывают, что как JCV LT-Ag, так и JCV Sm t-Ag взаимодействуют с общими белками-хозяевами, которые являются частью актин-миозиновой сети, рибосомными/РНК-связывающими белками и другими индивидуальными белками. Таким образом, белок p53 взаимодействует с малым и большим антигенами (Sm t-Ag и LT-Ag) JC-вируса [17–20].

Следует упомянуть, что описано взаимодействие антигенов JC-вируса с широким спектром молекул, регулирующих клеточный цикл, с чем связывают онкогенный потенциал JC-вируса и родственного ему полиомавируса SV40 [16]. Нам не удалось найти в литературе описание механизмов, обуславливающих экспрессию Ki-67 в причудливых астроцитах, хотя описаны случаи пере-

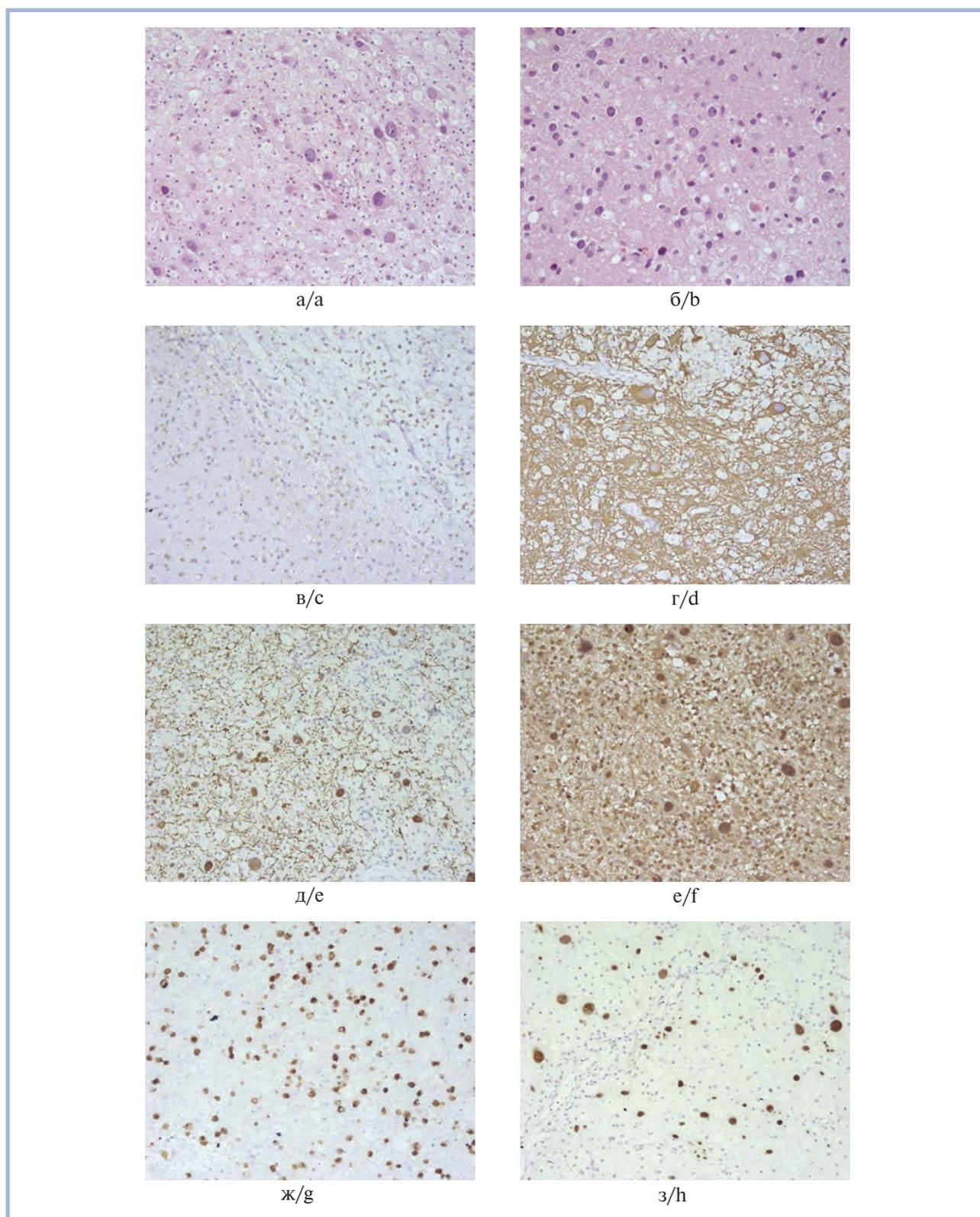


Рис. 3. Морфологическая картина ПМЛ.

а — крупные причудливые астроциты, макрофаги; б — олигодендроглициты с «лаковыми» ядрами, в части из которых светлые внутриядерные включения, $\times 400$; в — CD68; г — GFAP; д — NF; е — Vim; ж — Ki-67; з — p53; а, б — окраска гематоксилином и эозином, а, в—з — $\times 200$.

Fig. 3. Morphological picture of PML.

а — pathological focus with large bizarre astrocytes, macrophages, $\times 200$; б — oligodendroglia with «lacquer» nuclei, some of which have light intranuclear inclusions; с — CD68; d — GFAP; e — NF; f — Vim; g — Ki-67; h — p53; a, b — H&E, c—h — immunohistochemical reaction; a, c—h $\times 200$, b — $\times 400$.

крестной реакции между антителами к различным штаммам вирусов [21, 22]. Нельзя исключить, что сверхэкспрессия Ki-67 в очаге ПМЛ объясняется схожим механизмом с экспрессией p53.

Таким образом, клетки с морфологическими признаками вирусного поражения в случае активного течения процесса могут давать ложноположительное ядерное окрашивание при ИГХ-исследовании.

Следует подчеркнуть еще и то, что в литературе данный вопрос освещен недостаточно, и тем более мало дано объяснений этому феномену, который может крайне затруднить диагностический процесс, особенно при малом объеме биопсии.

Заключение

ПМЛ — это подострое демиелинизирующее поражение головного мозга, вызванное инфицированием олигодендроцитов и астроцитов литическим вирусом JC.

Гистологическое исследование и микроскопическая оценка изменений головного мозга для постановки диагноза ПМЛ являются приоритетными, это обусловлено

наличием перекрестной иммунореактивности при ИГХ-исследовании пораженных вирусом клеток.

Рекомендуемая прижизненная биопсия не всегда помогает в четкой верификации ПМЛ в связи с ограниченным объемом тканевых фрагментов, представляемых для исследования.

Во избежание неправильной трактовки данных ИГХ-исследования целесообразно производить забор биопсийного материала из разных мест пораженных участков мозга для возможности пространственной гистологической оценки патологического процесса.

Участие авторов

Концепция — О.М. Воробьева, Ю.М. Забродская

Сбор и обработка материала — И.А. Самусенко, Д.А. Ситовская, К.К. Куканов

Написание текста — О.М. Воробьева, Ю.М. Забродская, Н.М. Калинина, Д.А. Ситовская, К.К. Куканов

Редактирование — Ю.М. Забродская, В.Н. Эллиниди

Финансирование. Данная публикация осуществлена за счет средств государственного задания №121031000359-3.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, Pace A, Cheung A, Chen LL, Berman M, Zein F, Wilson E, Yednock T, Sandrock A, Goelz SE, Subramanyam M. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol*. 2010;68(3):295-303. <https://doi.org/10.1002/ana.22128>
- Bowen LN, Smith B, Reich D, Quezado M, Nath A. HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(11):662-674. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.149>
- Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain*. 1958;81(1):93-111. <https://doi.org/10.1093/brain/81.1.93>
- Santa Cruz KS, Roy G, Spigel J, Bearer EL. Neuropathology of JC virus infection in progressive multifocal leukoencephalopathy in remission. *World J Virol*. 2016;5(1):31-37. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i1.31>
- Tan CS, Korallnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2010;9(4):425-437. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70040-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70040-5)
- Brew BJ, Davies NW, Cinque P, Clifford DB, Nath A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(12):667-679. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.164>
- Hamaguchi M, Suzuki K, Fujita H, Uzuka T, Matsuda H, Shishido-Hara Y, Arai S, Nakamura T, Kikuchi S, Nakamichi K, Saijo M, Hirata K. Successful treatment of non-HIV progressive multifocal leukoencephalopathy: case report and literature review. *J Neurol*. 2020;267(3):731-738. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09629-x>
- Mighell AJ, Hume WJ, Robinson PA. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Dis*. 1998;4(3):217-223. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.1998.tb00282.x>
- Hirokawa M, Carney JA. Cell membrane and cytoplasmic staining for MIB-1 in hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(4):575-578. <https://doi.org/10.1097/0000478-200004000-00013>
- Jaconi M, Magni F, Raimondo F, Ponzoni M, Chinello C, Smith A, Piga I, Fusco N, Di Bella C, Pagni F. TdT expression in germ cell tumours: a possible immunohistochemical cross-reaction and diagnostic pitfall. *J Clin Pathol*. 2019;72(8):536-541. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205713>
- Hattori H. Sclerosing haemangioma of the lung is positive for MIB-1 in cell membrane and cytoplasmic staining pattern. *Histopathology*. 2002;40(3):291-293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01330.x>
- Kim BH, Bae YS, Kim SH, Jeong HJ, Hong SW, Yoon SO. Usefulness of Ki-67 (MIB-1) immunostaining in the diagnosis of pulmonary sclerosing hemangiomas. *APMIS*. 2013;121(2):105-110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02945.x>
- Leonardo E, Volante M, Barbareschi M, Cavazza A, Dei Tos AP, Bussolati G, Papotti M. Cell membrane reactivity of MIB-1 antibody to Ki67 in human tumors: fact or artifact? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15(2):220-223. <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000213122.66096.f0>
- Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JM. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2009;54(2):254-257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03191.x>
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Rodriguez F, Tihan T. *Diagnostic pathology: neuropathology*. 2nd ed. Elsevier; 2016;805.
- Saribas S, Safak M. A comprehensive proteomics analysis of the JC Virus (JCV) large and small tumor antigen interacting proteins: large T primarily targets the host protein complexes with V-ATPase and ubiquitin ligase activities while small t mostly associates with those having phosphatase and chromatin-remodeling functions. *Viruses*. 2020;12(10):1192. <https://doi.org/10.3390/v12101192>
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>

18. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17(1):43-52. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90293-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90293-9)
19. Crawford LV, Lane DP, Denhardt DT, Harlow EE, Nicklin PM, Osborn K, Pim DC. Characterization of the complex between SV40 large T antigen and the 53K host protein in transformed mouse cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1980;44(Pt.1):179-187. <https://doi.org/10.1101/sqb.1980.044.01.021>
20. Krynska B, Gordon J, Otte J, Franks R, Knobler R, DeLuca A, Giordano A, Khalili K. Role of cell cycle regulators in tumor formation in transgenic mice expressing the human neurotropic virus, JCV, early protein. *J Cell Biochem*. 1997;67(2):223-230. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19971101\)67:2<223::aid-jcb7>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19971101)67:2<223::aid-jcb7>3.0.co;2-z)
21. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, Levi JE, Pannuti CS, Romano CM. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol*. 2017;89(8):1477-1479. <https://doi.org/10.1002/jmv.24789>
22. Wan WY, Lim SH, Seng EH. Cross-reaction of Sera from COVID-19 patients with SARS-CoV assays. *Ann Acad Med Singap*. 2020;49(7):523-526.

Поступила 17.11.2021

Received 17.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Неразвивающийся частичный пузырный занос в слитной дихориальной плаценте с нормальным развитием второго близнеца

© И.В. БАРИНОВА¹, И.Н. ВОЛОШУК¹, М.А. ЧЕЧНЕВА¹, Т.С. КОВАЛЕНКО¹, А.А. АКСЕНОВА¹,
В.В. СТРЕЛЬНИКОВ², Е.Б. КУЗНЕЦОВА², Т.С. БЕСКОРОВАЙНАЯ²

¹ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии», Московская область, Россия;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Описано наблюдение дихориальной двойни со слитной плацентой, одна часть которой представлена тканью частичного пузырного заноса (ЧПЗ), вторая — плацентой обычного строения с нормальным развитием второго близнеца. Роды произошли на сроке 38 нед живой здоровой девочкой массой 3250 г. Единый плацентарный диск состоял из двух слившихся плацент с четкой границей между ними. Плацента живорожденной девочки имела нормальное строение, вторая часть диска представлена тканью ЧПЗ с гигантскими ворсинками причудливой формы, некоторые из них с центральными полостями с отсутствием сосудов в ворсинах и фиброзом стромы, низкой пролиферативной активностью ворсинчатого трофобласта, с резким сужением межворсинчатого пространства. Генетическое исследование было проведено на материале парафиновых блоков из двух частей плацентарного диска, содержащих ткань ворсинчатого хориона, и крови родителей. При сравнительном анализе ДНК, выделенного из парафинового блока ЧПЗ, с ДНК родителей установлено наличие диандрической диспермной триплоидии. В плаценте живой девочки патологии хромосом не выявлено. Для пузырного заноса в случае многоплодной беременности характерно увеличение объема пораженной плаценты по сравнению с нормальной плацентой близнеца. В нашем наблюдении наличие в плаценте с ЧПЗ признаков, характерных для плацент с антенатальной гибелью плода, фиброза стромы ворсин с сохранением отдельных «цистерн», низкой пролиферативной активности трофобласта позволяет говорить о регрессе ЧПЗ.

Ключевые слова: частичный пузырный занос, диандрическая диспермная триплоидия, дихориальная двойня, патоморфологическое исследование плаценты.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Барина И.В. — <https://orcid.org/0000-0003-0447-1734>

Волошук И.Н. — <https://orcid.org/0000-0002-7059-5105>

Чечнева М.А. — <https://orcid.org/0000-0001-7066-3166>

Коваленко Т.С. — <https://orcid.org/0000-0001-8995-6727>

Аксенова А.А. — <https://orcid.org/0000-0003-1591-0712>

Стрельников В.В. — <https://orcid.org/0000-0001-9283902X>

Кузнецова Е.Б. — <https://orcid.org/0000-0001-5825-0430>

Бескорвайная Т.С. — <https://orcid.org/0000-0001-5656-2561>

Автор, ответственный за переписку: Волошук И.Н. — e-mail: ivoloshchuk@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Барина И.В., Волошук И.Н., Чечнева М.А., Коваленко Т.С., Аксенова А.А., Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Бескорвайная Т.С. Неразвивающийся частичный пузырный занос в слитной дихориальной плаценте с нормальным развитием второго близнеца. *Архив патологии*. 2022;84(2):44–50. <https://doi.org/10.17116/patol20228402144>

Twin gestation with regressive partial hydatidiform mole and coexisting live fetus

© I.V. BARINOVA¹, I.N. VOLOSHCHUK¹, M.A. CHECHNEVA¹, T.S. KOVALENKO¹, A.A. AKSYONOVA¹,
V.V. STRELNIKOV², E.B. KUZNETSOVA², T.S. BESKOROVAYNAYA²

¹Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow Region, Russia;

²Scientific Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

ABSTRACT

The case of dichorionic twin pregnancy is described, with a fused placenta, one part of which is represented by a tissue of partial hydatidiform mole (PHM) with signs of regression, the second part is a placenta of a common structure with a normal development of the second twin. The delivery took place at the term of 38 weeks with a live healthy girl weighing 3250 g. A single placental disc consisted of two fused placentas with a clear boundary between them. The placenta of a live-born girl was mature, with focal chorangiosis, the second part of the disc was represented by the PHM tissue with avascular giant bizarre villi, some of them with central cisterns, with stromal fibrosis, low proliferative activity of the villous trophoblast and a significant narrowing of the intervillous space. A genetic study was carried out on the material of paraffin blocks from two parts of the placental disc containing the tissue of the villous chorion, and the blood of the parents. Comparative analysis of DNA isolated from the paraffin block of PHM with the DNA of the parents revealed the presence of diandric dispermic triploidy. No chromosomal pathology was found in the placenta of a living girl. For hydatidiform mole in the case of multiple pregnancy, an increase in the volume of the affected placenta is characteristic compared to the normal placenta of the twin. In our observation, the presence in the placenta with PHM

signs characteristic of placentas with antenatal fetal death, stromal fibrosis of the villi and low proliferative activity of the trophoblast suggests a regression of PHM.

Keywords: partial hydatidiform mole, diandric dispermic triploidy, dichorionic twins, placental pathology.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Barinova I.V. — <https://orcid.org/0000-0002-7059-5105>
Voloshchuk I.N. — <https://orcid.org/0000-0002-7059-5105>
Chechneva M.A. — <https://orcid.org/0000-0001-7066-3166>
Kovalenko T.S. — <https://orcid.org/0000-0001-8995-6727>
Aksenova A.A. — <https://orcid.org/0000-0003-1591-0712>
Strelnikov V.V. — <https://orcid.org/0000-0001-9283902X>
Kuznetsova E.B. — <https://orcid.org/0000-0001-5825-0430>
Beskorovaynaya T.S. — <https://orcid.org/0000-0001-5656-2561>
Corresponding author: Voloshchuk I.N. — e-mail: ivoloshchuk@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Barinova IV, Voloshchuk IN, Chechneva MA, Kovalenko TS, Aksenova AA, Strelnikov VV, Kuznetsova EB, Beskorovaynaya TS. Twin gestation with regressive partial hydatidiform mole and coexisting live fetus. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):44–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402144>

Частичный пузырный занос (ЧПЗ) — вариант гестационной трофобластической болезни, который характеризуется сочетанием ткани плаценты нормального строения и гигантских ворсин. Патологически измененные ворсины неправильной формы с фестончатыми очертаниями, умеренной, обычно очаговой пролиферацией ворсинчатого цитотрофобласта, выраженным отеком стромы, нередко с формированием пузырьковидных ворсин [1]. Большинство случаев ЧПЗ обусловлено триплоидией — наличием тройного набора хромосом, причем третий, дополнительный набор, имеет отцовское происхождение. Основной механизм формирования такой патологии — оплодотворение яйцеклетки двумя сперматозоидами (диспермное оплодотворение), что приводит к образованию организма с двумя наборами отцовских и одним набором материнских хромосом (диандрически-моногиническая триплоидия) [2, 3]. В большинстве случаев (70% и более) кариотип зародыша 69, XXУ, реже — 69, XXX и редко — 69, XYУ [1]. Развитие ЧПЗ связано с преобладанием отцовских хромосом. Вариант триплоидии с преобладанием материнских хромосом (дигиническая моноандрическая триплоидия), обусловленный чаще всего нарушением мейоза, напротив, характеризуется гипоплазией плаценты, при нем не наблюдается кистозной трансформации ворсин [4].

Большинство зародышей с триплоидией элиминируются преимущественно в I триместре беременности, частично — в начале II [3, 5]. При спонтанных абортах триплоидия встречается в 8–10% случаев [6, 7]. В III триместре ЧПЗ диагностируется крайне редко.

Дифференциальный диагноз ЧПЗ проводят с полным пузырным заносом (ППЗ), гидропическим абортom, мезенхимальной дисплазией плаценты, изменениями плаценты при хромосомных aberrациях [1, 8]. Наиболее важна правильная и своевременная диагностика ППЗ в связи с высоким риском развития осложнений беременности при данном заболевании, в первую очередь персистирующей трофобластической болезни (ПТБ). Риск ПТБ при ЧПЗ, согласно данным ВОЗ, составляет 0,5–5%, что существенно ниже, чем при ППЗ [1]. В некоторых проспективных исследованиях, включавших от 20 до 154 случаев ЧПЗ, не выявлено ни одного случая ПТБ [2, 9, 10]. В то же время в ряде публикаций с описанием сочетания ЧПЗ с жизнеспособным

плодом отмечено развитие у пациенток ПТБ, в том числе с метастазами в легких [11, 12]. Y. Wang и соавт. [13], суммируя данные литературы и собственные результаты, установили развитие ПТБ у 5 из 11 пациенток с сочетанием ЧПЗ с жизнеспособным плодом, причем наличие ПТБ не коррелировало с длительностью беременности.

Большие сложности в диагностике пузырного заноса возникают при многоплодной беременности с наличием одного живого плода и двух плацент, имеющих обычное строение и кистозно-измененное. Подобное сочетание нередко расценивают как ЧПЗ. Однако при корректном ультразвуковом, морфологическом, генетическом исследовании чаще всего диагностируется ППЗ. Документированные наблюдения ЧПЗ при дихориальных двойнях немногочисленны [11, 12, 14].

Приводим наблюдение ЧПЗ при дихориальной двойне с необычным течением — частичным регрессом кистозной плаценты.

Пациентка С., 32 года, 1-я беременность 4 года назад закончилась рождением живого доношенного ребенка (кесарево сечение в связи с выраженной миопией). Настоящая беременность 2-я, самопроизвольная. При УЗИ на сроке 6 нед диагностирована дихориальная двойня с анэмбрионией второго плода. В 12 нед беременности ультразвуковая картина соответствовала одноплодной беременности с нормальной структурой хориона. На сроке беременности 17 нед при УЗИ диагностировано низкое расположение плаценты с утолщением ее по левому ребру до 4 см с множественными анэхогенными мелкокистозными включениями без кровотока.

При УЗИ в МОНИИАГ в 19–20 нед беременности ультразвуковая картина наиболее соответствовала ЧПЗ (дифференциальный диагноз с мезенхимальной дисплазией плаценты). Кисты в яичнике не выявлены.

Беременная консультирована в Центре трофобластической болезни ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, была подтверждена ультразвуковая картина ЧПЗ с необходимостью дифференциального диагноза с мезенхимальной дисплазией плаценты, а также визуализированы остатки неполностью резорбированного плодного яйца после гибели 2-го эмбриона из двойни на раннем сроке беременности.

Уровень хорионического гонадотропина на всем протяжении беременности не превышал референсных значений, однако после 20-й недели беременности отмечено снижение показателя с 46 339 до 28 987 МЕ/мл на 24-й неделе. Показатель плацентарного лактогена был умеренно повышен на сроке 20 нед — 6,06 мг/л с дальнейшим понижением до нормы.

Клинически беременность протекала с угрозой преждевременных родов в 22 и 32 нед, проводилось стационарное лечение. Кровянистых выделений из половых путей в течение беременности не отмечалось. На сроке 38 нед родоразрешена в плановом порядке путем кесарева сечения в связи с истончением рубца на матке. Извлечена живая здоровая девочка массой 3250 г, ростом 49 см. Оценка состояния по шкале Апгар на 1-й минуте 8 баллов, на 5-й минуте 9 баллов. Послеродовой период протекал без осложнений. На 5-е сутки пациентка вместе с ребенком выписана домой. Ребенок растет и развивается согласно возрасту.

В послеродовом периоде уровень ХГЧ на 1-е сутки составляет 7055 МЕ/мл, на 4-е сутки — 714 МЕ/мл, через 1 мес — 2,0 МЕ/мл.

Результаты исследования последа

Плацента размером 21×17×2,5 см, массой 555 г. При макроскопическом исследовании примерно две трети диска обычного вида, одна треть плотная, серо-желтая (рис. 1, а, б). Между двумя частями имелась четкая граница с остатками оболочек. Единственная пуповина длиной 56 см, диаметром 1 см расположена в большей части плаценты. На разрезе большая часть плаценты обычного строения, умеренно полнокровна; в меньшей части плаценты ткань белесоватая, плотная, с умеренным числом кист разного диаметра. По краю диска определяется желтоватый слоистый участок клиновидной формы (рис. 1, в, г).

При микроскопическом исследовании плацента живой девочки на большем протяжении с хорангиозом, увеличенным числом синцитиальных узлов, участками нормальной зрелости с полнокровными сосудами и участками с гиповаскуляризацией и фиброзом стромы ворсин (рис. 2, а—в). Экспрессия Ki-67 и p57 соответствовала норме (рис. 2, г—е).

Меньшая часть плацентарного диска с широким слоем субхориального фибриноида, истонченной лишенной

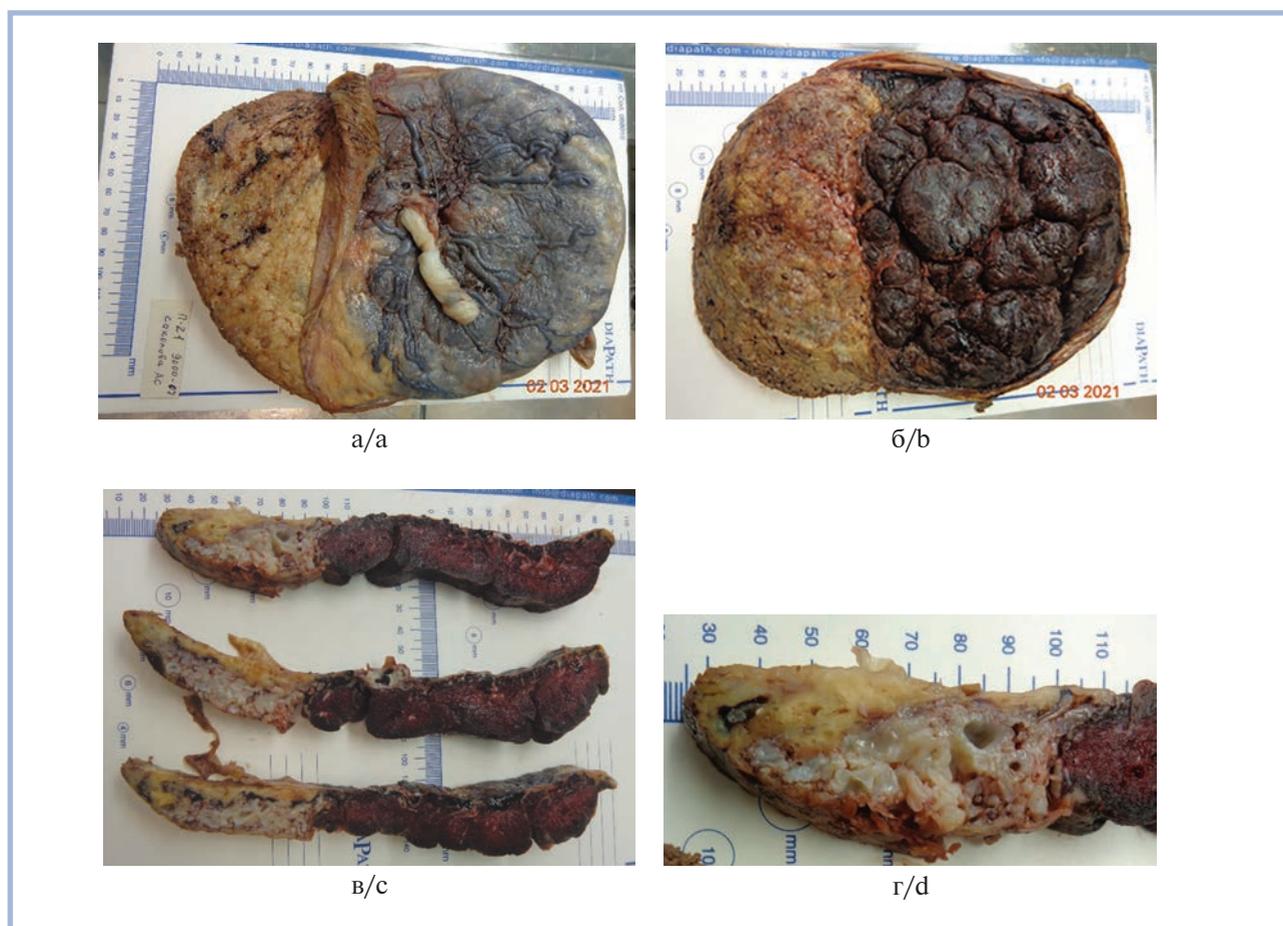


Рис. 1. Слитная дихориальная диамниотическая плацента с частичным пузырным заносом.

а — плодовая поверхность с единственной пуповиной и остатками плодных оболочек на границе двух плацент; б — материнская поверхность с четкой границей между плацентами; в, г — вид на разрезе: плацента с частичным пузырным заносом с отдельными кистами и широким слоем фибриноида в краевой зоне, плацента живой девочки с умеренным полнокровием паренхимы.

Fig. 1. Fused dichorionic diamniotic placenta with partial hydatidiform mole.

а — fetal surface with a single umbilical cord and remnants of membranes at the border of two placentas; б — maternal surface with a clear boundary between the placentas; в, г — on the section: placenta with partial hydatidiform mole with separate cysts and a wide layer of fibrinoid in the marginal zone, the placenta of a living girl with moderate plethora of the parenchyma.

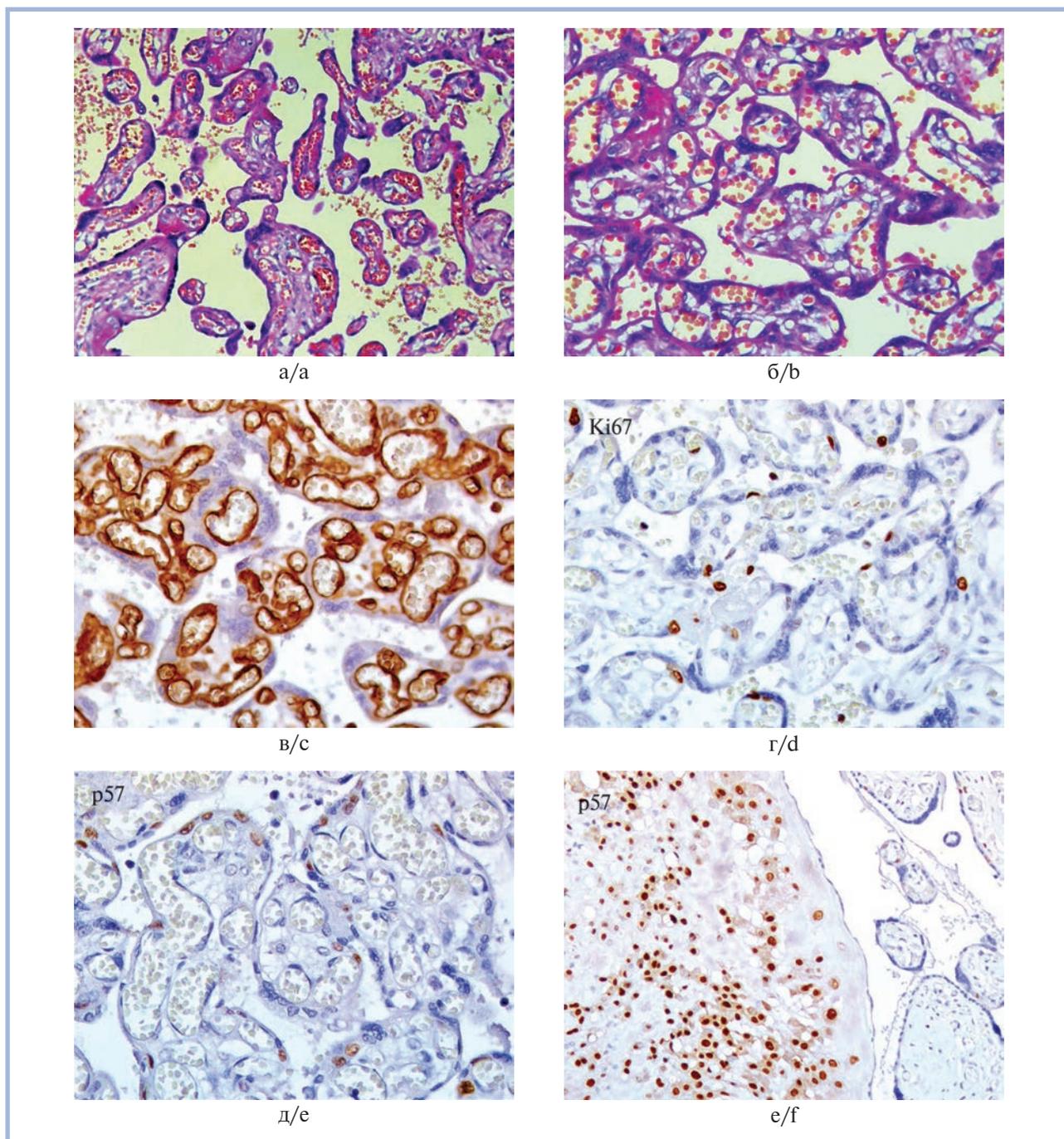


Рис. 2. Микроскопическое строение плаценты живой девочки.

а — зрелое ворсинчатое дерево с полнокровными сосудами и умеренным увеличением числа синцитиальных узлов, $\times 200$; б — обширные очаги хорангиоза, $\times 400$; в — экспрессия CD34 в капиллярах ворсин при хорангиозе, $\times 400$; г — экспрессия Ki67 в клетках ворсинчатого трофобласта, $\times 400$; д — экспрессия p57 в клетках ворсинчатого трофобласта, $\times 400$; е — экспрессия p57 в клетках вневорсинчатого трофобласта в клеточном островке (внутренний положительный контроль), $\times 200$; а, б — окраска гематоксилином и эозином, в—е — иммуногистохимическая реакция.

Fig. 2. Microscopic structure of the placenta of a living girl.

а — mature villous tree with congested vessels and a moderate increase in the number of syncytial knots, $\times 200$; б — extensive foci of chorangiosis, $\times 400$; в — CD34 expression in villus capillaries in chorangiosis, $\times 400$; д — Ki67 expression in villous trophoblast cells, $\times 400$; е — p57 expression in villous trophoblast cells; ф — p57 expression in extravillous trophoblast of cell island, $\times 200$. а, б — H&E; в—ф — immunohistochemical reaction.

сосудов хориальной пластинкой, бессосудистыми фибрированными ворсинами разного диаметра, преимущественно гигантскими, отдельные из них с очаговым отеком и образованными центральными полостями. Хориальный эпителий

на большем протяжении однослойный, местами со скоплением дистрофически измененных ядер (рис. 3, а, б).

При иммуногистохимическом исследовании в плаценте с ЧПЗ определяются небольшие очаги Ki-67-положительных

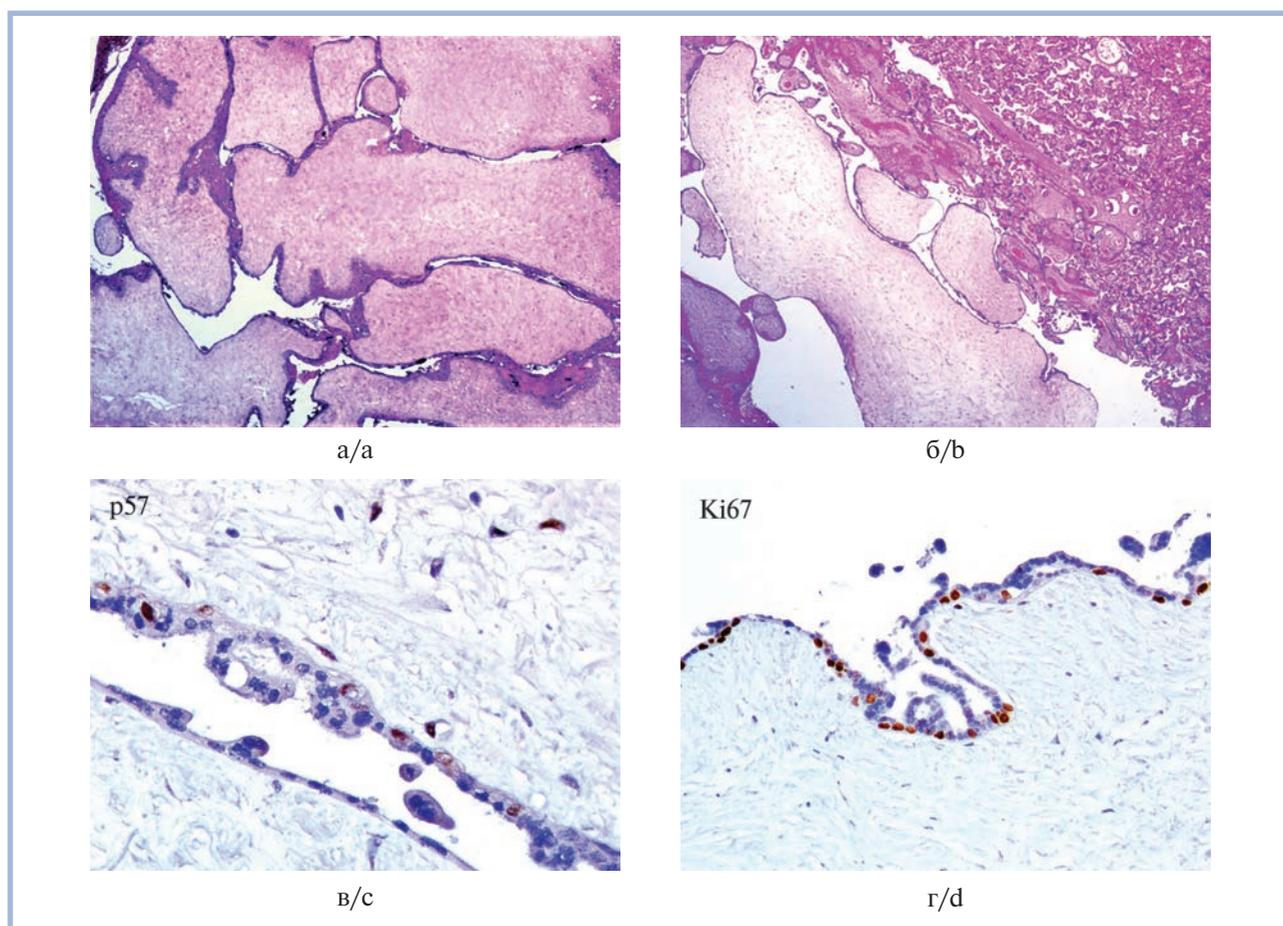


Рис. 3. Микроскопическое строение плаценты с триплоидией.

а — сочетание бессосудистых гигантских ворсин причудливой формы и мелких ворсин с умеренным фиброзом стромы, межворсинчатое пространство резко сужено, $\times 25$; б — граница двух плацент, $\times 25$; в — экспрессия p57 в немногочисленных клетках ворсинчатого цитотрофобласта и стромы (представлены фрагменты двух гигантских ворсин), $\times 400$; г — экспрессия Ki-67 в клетках ворсинчатого цитотрофобласта, $\times 200$; а, б — окраска гематоксилином и эозином, в, г — иммуногистохимическая реакция.

Fig. 3. Microscopic structure of the triploid placenta.

а — a combination of avascular giant bizarre and small villi with moderate stromal fibrosis, the intervillous space is narrow, $\times 25$; б — the border of two placentas, $\times 25$; в — p57 expression in a few cells of villous cytotrophoblast and stroma (fragments of two giant villi are shown), $\times 400$; д — Ki67 expression in villous trophoblast cells, $\times 400$. а, б — H&E, в, д — immunohistochemical reaction.

ядер в эпителии ворсин, экспрессия p57 наблюдалась в немногочисленных клетках как ворсинчатого трофобласта, так и стромы (рис. 3, в, г).

Генетическое исследование проведено на материале парафиновых блоков из двух частей плацентарного диска, содержащих ткань ворсинчатого хориона, и крови родителей.

Проведена количественная флуоресцентная мультилокусная ПЦР (Amel, D13S258, D13S634, D13S742, D18SS535, D18S386, D18S391, D21S11, D21S1411, IFNAR) с последующим фрагментным анализом на генетическом анализаторе ABI 3500.

При сравнительном анализе ДНК, выделенной из парафинового блока патологически измененной плаценты, с ДНК родителей установлено наличие диплоидного набора маркеров отцовского происхождения и гаплоидного набора маркеров материнского происхождения, что соответствует диандрической диспермной триплоидии (частичному пузырному заносу). В плаценте живой девочки патологии хромосом не выявлено.

Представленное наблюдение демонстрирует ЧПЗ с подтвержденной генетическим анализом диандрической триплоидией при многоплодной беременности с нормальным развитием второго плодного яйца и рождением живой доношенной девочки.

Особенностью наблюдения является наличие регресса структурных особенностей ЧПЗ. Для пузырного заноса в случае многоплодной беременности характерно увеличение объема пораженной плаценты по сравнению с нормальной плацентой близнеца [15–17]. В литературе мы встретили лишь одно наблюдение частичной регрессии ЧПЗ при близнецовой беременности живым плодом, при которой отмечено уменьшение объема пораженной плаценты и снижение уровня хорионического гонадотропина [18].

Сходные по механизму развития изменения в плаценте могут наблюдаться при синдроме «исчезающего близнеца» (vanishing twin syndrome), когда при гибели одного или нескольких эмбрионов развитие оставшегося близнеца продолжается, а ткань погибшего (погибших) эмбрионов частично или полностью исчезает. Такой феномен наблюда-

ется на ранних сроках при двуплодной беременности в 36% наблюдений, а при беременности с тремя и более плодными яйцами — в половине случаев [19]. Основным механизмом «исчезающего плода» — резорбция зародыша, что характерно для I триместра и редко наблюдается после 12 нед беременности. Возможно также формирование пустого плодного яйца. Современные возможности ультразвукового метода позволяют четко документировать данные изменения при тщательном исследовании беременности на ранних сроках.

Учитывая, что большая часть зародышей с триплоидным кариотипом гибнет на ранних сроках, развитие подобных изменений при многоплодной беременности с ЧПЗ достаточно вероятно. Смерть плода с триплоидией при дихориальной близнецовой беременности с сохранением жизнеспособности близнеца с нормальным кариотипом описана рядом авторов при сроке беременности 12—20 нед [20, 21].

Морфологические изменения в плаценте при синдроме «исчезающего близнеца» представлены в единичных

работах. Описано наличие очаговых дегенеративных изменений в плаценте с массивным периворсинковым отложением фибрина, в 1 из 5 представленных наблюдений были также обнаружены остатки эмбриональных тканей [22]. L.E. Sulak и соавт. [23] описывают скопление аморфного материала и «дегенеративные» ворсины.

В нашем наблюдении наличие в плаценте с ЧПЗ признаков, характерных для плацент с антенатальной гибелью плода, фиброза стромы ворсин с сохранением отдельных «цистерн», низкой пролиферативной активности трофобласта позволяет говорить о регрессе ЧПЗ. Структурные особенности ворсинчатого дерева соответствуют остановке развития плаценты во II триместре беременности, что косвенно подтверждается значительным снижением уровня хорионического гонадотропина на сроке 20—24 нед беременности.

Фрагмент работы выполнен в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ»

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Hui P, Baergen R, Cheung ANY, Fukunaga M, Gersell D, Lage JM, Ronnett BM, Sebire NG and Wells M. Gestational trophoblastic disease. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Yong RH, eds. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*. 4th ed. Lyon: IARC; 2014;155-167.
- Scholz NB, Bolund L, Nyegaard M, Faaborg L, Jørgensen MW, Lund H, Niemann I, Sunde L. Triploidy — observations in 154 diandric cases. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142545. eCollection 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142545>
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1807-1820.
- Fleischer J, Shenoy A, Goetzinger K, Cottrell CE, Baldrige D, White FV, Shinawi M. Digynic triploidy: utility and challenges of noninvasive prenatal testing. *Clin Case Rep*. 2015;3(6):406-410. <https://doi.org/10.1002/ccr3.247>
- Massalska D, Ozdarska K, Roszkowski T, Bijok J, Kucińska-Chahwan A, Panek GM, Zimowski JG. Distribution of diandric and digynic triploidy depending on gestational age. *J Assist Reprod Genet*. 2021 May 13. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02202-4>
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30(3):237-241. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2004.00191.x>
- Wang BT, Chong TP, Boyar FZ, Kopita LP, El-Naggar MM, Sahoo T, Wang J-C, Hemmat M, Haddadin MH, Owen R, Anguiano AL. Abnormalities in spontaneous abortions detected by G-banding and chromosomal microarray analysis (CMA) at a national reference laboratory. *Mol Cytogenet*. 2014;7:33. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-33>
- Himoto Y, Kido A, Minamiguchi S, Moribata Y, Okumura R, Mogami H, Nagano T, Konishi I, Togashi K. Prenatal differential diagnosis of complete hydatidiform mole with a twin live fetus and placental mesenchymal dysplasia by magnetic resonance imaging. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40(7):1894-1900. <https://doi.org/10.1111/jog.12441>
- Kaneki E, Kobayashi H, Hirakawa T, Matsuda T, Kato H, Wake N. Incidence of postmolar gestational trophoblastic disease in androgenetic moles and the morphological features associated with low risk postmolar gestational trophoblastic disease. *Cancer Sci*. 2010;101(7):1717-1721. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01602.x>
- Massalska D, Bijok J, Kucińska-Chahwan A, Zimowski JG, Ozdarska K, Raniszewska A, Panek GM, Roszkowski T. Maternal complications in molecularly confirmed diandric and digynic triploid pregnancies: single institution experience and literature review. *Arch Gynecol Obstet*. 2020;301(5):1139-1145. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05515-4>
- Gajewska M, Zyguła A, Wielgos M, Szewczyk G. Twin pregnancy with a partial hydatidiform mole and a coexistent live fetus. Diagnostic and therapeutic dilemmas. A case report and a review of literature. *Ginecologia Polska*. 2020;91(10):589-594. <https://doi.org/10.5603/GP.a2020.0109>
- Lin M, Chen J, Liao B, He Zh, Lin Sh, Luo Y. When a vesicular placenta meets a live fetus: case report of twin pregnancy with a partial hydatidiform mole. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2021;21(1):694. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04160-2>
- Wang Y, Qian H, Wang J. Medical termination of a partial hydatidiform mole and coexisting fetus during the second trimester: a case report. *Oncol Lett*. 2015;10(6):3625-3628. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3743>
- Zhang R-Q, Zhang J-R, Li S-D. Termination of a partial hydatidiform mole and coexisting fetus: a case report. *World J Clin Cases*. 2019;7(20):3289-3295. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i20.3289>
- Chu W, Chapman J, Persons DL, Fan F. Twin pregnancy with partial hydatidiform mole and coexistent fetus. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(11):1305-1306. <https://doi.org/10.5858/2004-128-1305-TPWPHM>
- Rathod S, Rani R, John LB, Samal SK. Successful outcome of twin gestation with partial mole and co-existing live fetus: a case report. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(8):QD01-2. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2015/13038.6268>
- Callen DF, Fernandes H, Hull YJ, Svigos JM, Chambers HM, Sutherland GR. A normal 46,XX infant with a 46,XX/69XXY placenta: a major contribution to the placenta is from a resorbed twin. *Prenat Diagn*. 1991;11(7):437-442. <https://doi.org/10.1002/pd.1970110705>
- Gorgen H, Akca A, Gulac B, Gündüz N, Yarsıllık Güleroglu F. Partial regression of a hydatidiform mole with coexisting live fetus in a twin gestation: case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2016;37(4):584-586.

19. Zamani Z, Parekh U. Vanishing twin syndrome. In: *Stat Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. 2021 Jul 31.
20. Preis K, Ciach K, Kowalewska-Włas A, Wójcik D, Swiatkowska-Freundi M, Klasa-Mazurkiewicz D. Twin pregnancy with single fetal death due to triploidy — a case report. *Ginecol Pol.* 2005;76(8):648-651. (In Polish).
21. Copeland JW, Stanek J. Dizygotic twin pregnancy with a normal fetus and a nodular embryo associated with a partial hydatidiform mole. *Pediatr Dev Pathol.* 2010;13(6):476-480. <https://doi.org/10.2350/09-11-0735-CR.1>
22. Jauniaux E, Elkazen N, Leroy F, Wilkin P, Rodesch F, Hustin J. Clinical and morphologic aspects of the vanishing twin phenomenon. *Obstet Gynecol.* 1988;72(4):577-581.
23. Sulak LE, Dodson MG. The vanishing twin: pathologic confirmation of an ultrasonographic phenomenon. *Obstet Gynecol.* 1986;68(6):811-815.

Поступила 15.12.2021

Received 15.12.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Оценка гистологической активности колитов

© Х.М. АХРИЕВА¹, Е.А. КОГАН², А.С. ТЕРТЫЧНЫЙ², С.Г. РАДЕНСКА-ЛОПОВОК^{2,5}, О.В. ЗАЙРАТЬЯНЦ³, Л.С. СЕЛИВАНОВА⁴

¹ФГБОУ ВПО «Ингушский государственный университет», Назрань, Россия;

²ФГАОУ ВПО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВПО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия;

⁵ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Гистологическая активность воспаления толстой кишки — крайне важный морфологический критерий, который учитывается при диагностике колита. Однако определение ее степени субъективно и до настоящего времени не имеет общепризнанного принципа градации. В статье охарактеризованы наиболее известные шкалы-схемы оценки тяжести колитов, включающие степень микроскопических изменений. Приведены результаты анализа степени гистологической активности на материале колонобиоптатов при колитах различной этиологии (467 наблюдений). Показано, что первоначально разработанная для градации тяжести язвенного колита шкала Гебоэса может применяться для оценки гистологической активности при всех формах колитов. Гистологическая характеристика активности воспаления должна быть отражена в патолого-анатомическом диагнозе: она крайне важна для принятия клинических решений. Данный показатель позволяет проводить сравнительный анализ клинических, эндоскопических и морфологических данных и лучше контролировать состояние пациента на фоне проводимого лечения.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, колит, активность.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ахриева Х.М. — <https://orcid.org/0000-0003-4683-1953>

Коган Е.А. — <https://orcid.org/0000-0003-1775-3060>

Тертычный А.С. — <https://orcid.org/0000-0001-5635-6100>

Зайратьянц О.В. — <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

Раденска-Лоповок С.Г. — <https://orcid.org/0000-0002-4669-260X>

Селиванова Л.С. — <https://orcid.org/0000-0001-6891-0009>

Автор, ответственный за переписку: Тертычный А.С. — e-mail: atertychnyy@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Ахриева Х.М., Коган Е.А., Тертычный А.С., Раденска-Лоповок С.Г., Зайратьянц О.В., Селиванова Л.С. Оценка гистологической активности колитов. *Архив патологии*. 2022;84(2):51–57. <https://doi.org/10.17116/patol20228402151>

Assessment of histologic activity in colitis

© Kh.M. AKHRIEVA¹, E.A. KOGAN², A.S. TERTYCHNYI², S.G. RADENSKA-LOPOVOK^{2,5}, O.V. ZAYRATYANTS³, L.S. SELIVANOVA⁴

¹Ingush State University, Nazran, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow, Russia;

³A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

⁴National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia;

⁵Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

ABSTRACT

The histological activity of the bowel inflammation is an extremely important morphological criterion that is encountered in the diagnosis of colitis. However, the determining of its degree is subjective and still does not have a generally accepted principle of gradation. The article describes the most common scale-schemes for assessing the severity of colitis, that include the degree of microscopic changes. The results of the analysis of the of histological activity degree on the material of colonobiopates in colitis of various etiologies (467 patients) are presented. It has been shown that the Geboes scale of ulcerative colitis can be used to assess histological activity in all forms of colitis. The histological features of inflammation should be reflected in the pathological diagnosis and are essential for clinical decision making. This index allows for a comparative analysis of clinical, endoscopic and morphological parameters and better control of the patient's condition during the treatment.

Keywords: inflammatory bowel disease, colitis, activity.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Akhrieva Kh.M. — <https://orcid.org/0000-0003-4683-1953>

Kogan E.A. — <https://orcid.org/0000-0003-1775-3060>

Tertychnyi A.S. — <https://orcid.org/0000-0001-5635-6100>
Radenska-Lopovok S.G. — <https://orcid.org/0000-0002-4669-260X>
Zayratyants O.V. — <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>
Selivanova L.S. — <https://orcid.org/0000-0001-6891-0009>
Corresponding author: Tertychnyi A.S. — e-mail: atertychnyy@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Akhrieva KhM, Kogan EA, Tertychnyi AS, Radenska-Lopovok SG, Zayratyants OV, Selivanova LS. Assessment of histologic activity in colitis. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):51–57. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402151>

Гистологическая активность воспаления толстой кишки — крайне важный морфологический критерий, который оценивается при постановке диагноза колита. Выраженность гистологической активности колита коррелирует с клиническими данными и эндоскопической картиной. Этот термин прочно вошел в диагностические критерии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и наряду с показателями клинической и эндоскопической активности указывает, имеется ли активная стадия или период обострения заболевания. По данным большинства авторов [1–3], гистологическая активность колита имеет несомненное прогностическое значение, определяя вероятность развития рецидива, дисплазии и даже ответа на стероидную терапию. Однако оценка ее степени остается крайне субъективной и до настоящего времени не получила общепризнанного принципа градации. Это связано с существованием большого количества схем и шкал, многие из которых были применены преимущественно на ограниченном материале и не воспроизводились в других исследованиях [1–3]. Традиционно оценка активности воспалительных изменений в биоптатах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) осуществляется при наличии в биоптате полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ). В первую очередь подразумевается присутствие в воспалительном инфильтрате нейтрофильных лейкоцитов. Эозинофильные лейкоциты и базофилы обычно не берутся в расчет. Наличие нейтрофильных лейкоцитов в слизистой оболочке, безусловно, рассматривается как проявление воспалительной реакции в любом отделе ЖКТ. Считается, что первоначально ПЯЛ появляются в собственной пластинке слизистой оболочки, проникая туда из капилляров, о чем свидетельствует расширение их просветов, с лейкостазом и феномен краевого стояния ПЯЛ. Затем ПЯЛ мигрируют между эпителиальными клетками, после чего они могут проникать в крипты и накапливаться в их просвете или на поверхности слизистой оболочки. Скопления ПЯЛ в просвете крипт с повреждением эпителия получили название «крипт-абсцессы». Разрушение покровного эпителия и эпителия крипт приводит к формированию эрозий с фибринозно-лейкоцитарным экссудатом. В дне эрозий характерен очаговый рост грануляционной ткани, могут обнаруживаться участки фибриноидного некроза. При прогрессировании процесса эрозии трансформируются в язвы в случае распространения дефекта на подслизистую основу стенки кишки. Приведенная последовательность событий подразумевает выделение определенных стадий активного воспалительного процесса.

В одной из первых работ, в которой была использована шкала для оценки активности воспаления в биоптатах слизистой оболочки толстой кишки, было предложено выделять 6 гистологических признаков активности: наличие ПЯЛ в собственной пластинке слизистой оболочки,

крипт-абсцессы, снижение содержания муцина в эпителии крипт, изменения покровного эпителия, плотность мононуклеарного клеточного инфильтрата и нарушение структуры крипт [4]. Каждый признак градуировался по степени выраженности от 0 до 3. Эта шкала получила название шкалы Райли. В исследование S.A. Riley и соавт. были включены пациенты только с язвенным колитом (ЯК). Вероятно, именно этой работе мы обязаны глубоко укоренившемуся взгляду на диагностическое значение крипт-абсцессов при ЯК. Некоторые эндоскописты описывают их при проведении рутинной колоноскопии, что, скорее всего, является преувеличением, а макроскопически видимые изменения больше соответствуют эрозиям.

Дальнейшим развитием шкалы Райли явилась получившая наибольшую известность шкала Гебоэса [5]. Эта шкала была предложена для оценки тяжести язвенного колита, которая включает в себя характеристику степени гистологической активности. В данной шкале выделяются шесть степеней (grade) — от 0 до 5, среди них пять (1–5) касаются оценки хронического воспаления (табл. 1).

Оценка собственно гистологической активности начинается со 2-й степени, которая называется «нейтрофилы и эозинофилы собственной пластинки слизистой» и включает отдельно подгруппы 2А для эозинофилов и 2В для нейтрофилов. Поэтому фактически гистологическая активность, оцениваемая при наличии в инфильтрате нейтрофильных лейкоцитов, начинается с подстепени (subgrade) 2В и, таким образом, согласно шкале Гебоэса, представлена 4 степенями от 2В до 5.

Подстепень 2В.1 определяется при «незначительном, но несомненном повышении» уровня нейтрофилов, затем выделяется умеренное (2В.2) и значительное (2В.3) повышение их количества в собственной пластинке слизистой. Степень 3 характеризует наличие нейтрофилов в эпителии. Подстепень 3.0 определяется при отсутствии нейтрофилов в эпителии. При дальнейшем нарастании активности происходит вовлечение все большего количества крипт от 3.1 (менее 5%) и 3.2 (менее 50%) до 3.3 (более 50% крипт). Следующая, 4-я степень гистологической активности, отражает разрушение/повреждение крипт, начиная от вероятного (4.1 и 4.2) до несомненного (4.3) их разрушения. Подстепень 4.1 диагностируется при появлении крипт-абсцессов, которые обозначены как «очаговый избыток нейтрофилов в части крипт», а 4.2 характеризуется «значительным уплощением» эпителия крипт (в кавычках приведен дословный перевод критериев). Последняя, 5-я степень, — это появление «эрозий и изъязвлений». Подстепень 5.1 определена как регенерирующий эпителий с воспалением в подлежащей строме, 5.2 обозначена как «возможные эрозии — очаговая десквамация» покровного эпителия, 5.3 — «несомненные эрозии», 5.4 — «язва или грануляционная ткань».

Таблица 1. Шкала оценки тяжести язвенного колита Гебоэса [5]

Table 1. Geboes grading scale for evaluation of the disease severity in ulcerative colitis [5]

<p>Степень 0 (структурные изменения) Подстепени: 0.0 — отсутствие нарушений, 0.1 — незначительные нарушения, 0.2 — слабые или умеренные нарушения, которые носят диффузный или мультифокальный характер, 0.3 — тяжелые диффузные или мультифокальные структурные нарушения</p> <p>Степень 1 (хроническая воспалительная инфильтрация) Подстепени: 1.0 — отсутствие повышения, 1.1 — незначительное, но несомненное повышение, 1.2 — умеренное повышение, 1.3 — значительное повышение</p> <p>Степень 2 (нейтрофилы и эозинофилы собственной пластинки) Подстепени 2А (эозинофилы): 2А.0 — отсутствие повышения, 2А.1 — незначительные, но несомненное повышение, 2А.2 — умеренное повышение, 2А.3 — значительное повышение Подстепени 2В (нейтрофилы): 2В.0 — отсутствие нейтрофилов, 2В.1 — незначительные, но несомненное повышение, 2В.2 — умеренное повышение, 2В.3 — значительное повышение</p> <p>Степень 3 (нейтрофилы в эпителии) Подстепени: 3.0 — отсутствие нейтрофилов, 3.1 — менее 5% крипт, 3.2 — менее 50% крипт, 3.3 — более 50% крипт</p> <p>Степень 4 (разрушение/повреждение крипт) Подстепени: 4.0 — отсутствие повреждения крипт, 4.1 — вероятное повреждение в виде очагового избытка нейтрофилов в части крипт, 4.2 — значительное уплощение эпителия крипт, 4.3 — несомненное разрушение крипт</p> <p>Степень 5 (эрозия или изъязвление) Подстепени: 5.0 — отсутствие эрозий, язв и грануляционной ткани, 5.1 — регенерирующий эпителий + воспаление в подлежащей строме, 5.2 — возможная эрозия — очаговая десквамация эпителия, 5.3 — несомненная эрозия, 5.4 — язва или грануляционная ткань</p>

Шкала Гебоэса построена по принципу учета нарастания выраженности патологических изменений, поэтому она позволяет оценить не только степень активности, но в ряде случаев и диагностировать нозологическую форму колита. Фактически она отражает алгоритм диагностики, который начинается с оценки структуры слизистой оболочки (степень 0, оценка структурных нарушений слизистой оболочки) и анализа хронического воспалительного инфильтрата (степени 1–5).

По мнению К. Geboes и соавт. [5], эозинофильные лейкоциты могут вносить свой вклад в активность воспаления, обладая способностью выделять компоненты своих гранул и генерировать активные молекулы кислорода. Однако не все авторы расценивают появление эозинофильных лейкоцитов в слизистой оболочке как проявление активности воспаления [2]. В нашей работе при оценке активности мы не брали в расчет присутствие эозинофилов, так как, на наш взгляд, они не имеют принципиального значения для оценки активности воспалительного процесса при изученных формах колитов.

Вклад лимфоцитов и плазматических клеток в гистологическую активность колитов многими авторами не признается, хотя активированные Т-лимфоциты могут повреждать клетки эпителия [6]. Важно подчеркнуть, что еще сложнее оценить плотность клеточного инфильтрата, а его повышение — это достаточно субъективный критерий. На наш взгляд, оценить количество лимфоцитов в препарате действительно сложно, и такой критерий, безусловно, субъективен.

С такими критериями, как эрозии, которые у К. Geboes и соавт. фигурируют как подстепени 5.1 и 5.2, уже, исходя из их обозначения, не все так однозначно. Еще при первой оценке шкалы Гебоэса, когда она была представлена, авторы указывали на сложность интерпретации этого критерия. Дело в том, что покровный эпителий очень быстро закрывает возникающий поверхностный дефект (подстепень 5.1). С другой стороны, в колонобиоптатах часто обнаруживается десквамация покровного эпителия, имеющая

артифициальный характер. Необходимо также помнить о воздействии гипертонических растворов на эпителий при подготовке к колоноскопии, при которой отмечают повреждение покровного эпителия и даже появление в нем одиночных лейкоцитов.

В шкале Гебоэса не фигурирует термин «крипт-абсцесс», вместо него выделены подстепени 4.1 («очаговое скопление лейкоцитов в части крипт») и 4.2 («уплощение эпителия крипт, содержащих лейкоциты в просвете»). Эти подстепени объединены в степень 4 («разрушение крипт»), но только подстепень 4.3 («несомненное разрушение крипт») соответствует определению этой степени.

Не ясна цель использования подстепеней с отсутствием того или иного признака, в частности, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 и 5.0, которые не используются на практике. При этом подстепени 0.0 и 1.0 фактически можно заменить на норму. Наше исследование показало, что эту подгруппу можно исключить.

Шкала Гебоэса, как и любая схема, при отражении динамического процесса подразумевает возможность не брать во внимание определенные этапы, часто выделенные искусственно. Так, при выраженном повышении содержания нейтрофилов в собственной пластинке их практически всегда уже можно было обнаружить в эпителии крипт и покровном эпителии, а при множественных крипт-абсцессах можно обнаружить поврежденный эпителий крипт или покровный эпителий. Активность всегда варьирует, но рекомендуется давать заключение на основании наиболее тяжелых изменений, поэтому предшествующая стадия не получает своего отражения даже при ее преобладании.

Несмотря на то что шкала Гебоэса была предложена более 20 лет назад, она по-прежнему остается самой цитируемой [1, 2]. Все последующие попытки разработать новые шкалы, несмотря на их кажущееся упрощение, не приводили к улучшению воспроизводимости. Так, новая шкала, получившая название Индекс Нанси (Nancy Index (NI), 2017) [7] имеет 4 уровня, учитывает как признаки хронического воспаления, так и показатели активности. В ней было

Таблица 2. Гистологическая активность при разных нозологических формах колитов

Table 2. Histological activity in different nosological forms of colitis

Форма колита	Оценка степени активности/подгруппа по шкале Гебоэса				Итого
	минимальная/2В	слабая/3	умеренная/4	высокая/5	
ВЗК:					
в том числе ЯК	—	4	33	43	80
БК	—	6	30	21	57
Инфекционный колит	2	10	28	11	51
Лекарственный колит	8	26	6	5	45
Ишемический колит	1	9	—	2	12
Псевдомембранозный колит	—	—	—	4	4
Микроскопический колит:					
в том числе лимфоцитарный	4	—	—	—	4
Колиты неустановленной этиологии	7	50	46	4	107
Всего	22	105	143	90	360

выделено 4 степени изменений, которые получили следующие обозначения:

- 1-я степень — хронический воспалительный инфильтрат без признаков активности;
- 2-я степень — слабая активность;
- 3-я степень — умеренная активность;
- 4-я степень — выраженная активность с признаками изъязвления.

Индекс Робарта (Robarts Histopathologic Index (RHI), 2017) также основан на шкале Гебоэса, его показатель варьирует от 0 до 33 и коррелирует с тяжестью гистологических изменений. Индекс Робарта показал хорошую воспроизводимость при оценке результатов ответа на терапию [8].

Индекс Робарта рассчитывается по формуле $RHI = 1 \cdot$ хронический воспалительный инфильтрат (от 0 до 3) + 2. нейтрофилы собственной пластинки слизистой (0—3) + 3. нейтрофилы в эпителии (0—3) + 5. эрозии и изъязвления (0—3) (на основании соответствующих подклассов по шкале Гебоэса).

Не прекращаются попытки построения новых шкал и их модернизации [9]. Однако практически никто из исследователей не пытался упростить шкалу и дать оценку только степени гистологической активности. Существуют различные варианты локализации нейтрофилов: в собственной пластинке, покровном эпителии, эпителии крипт и в просвете крипт, скопления лейкоцитарного экссудата на поверхности, в дне эрозий и язв.

На этом основании были предложены упрощенные схемы-шкалы из трех критериев активности: 1) нейтрофилы в собственной пластинке; 2) крипт-абсцессы; 3) грануляционная ткань.

Группой исследователей из Бельгии, включая самого К. Geboes, была предложена шкала, которая получила название «упрощенная шкала Гебоэса» [10]. Ее основным отличием было сохранение только двух подстепеней для степеней 0—3, была исключена степень 4 «деструкция крипт», а степень 5 превращена в степень 4 с сохранением 4 подстепеней. Авторы решили оставить спорный подпункт 5.1 «регенерирующий эпителий», дав ему название «уплощенный».

С целью изучения возможности объективизации оценки гистологической активности воспаления при колитах нами были изучены эндоскопические колонобиоптаты 467 больных, исследованные в централизованном патолого-анатомическом отделении Сеченовского университета. Возраст пациентов варьировал то 19 до 78 лет (средний

48±6 лет). Группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) ($n=137$) составили больные с ЯК ($n=80$) и болезнью Крона (БК) ($n=57$). Группу не-ВЗК-колитов ($n=223$) составили случаи инфекционного ($n=51$), лекарственного ($n=45$), ишемического ($n=12$), псевдомембранозного ($n=4$) и микроскопического лимфоцитарного ($n=4$) колита. Диагнозы были установлены с учетом комплекса клинико-лабораторных, эндоскопических и морфологических данных. В сложных случаях окончательный диагноз был обсужден на клинико-морфологических консилиумах. Несмотря на это, в достаточно большом количестве случаев ($n=107$) точную этиологию колита определить не удалось. Эти заключения также были оценены с учетом обнаруженных в этих случаях показателей гистологической активности.

На II этапе все случаи были пересмотрены участниками исследования для уточнения степени гистологической активности. Использовали стандартные гистологические препараты, содержащие серийные срезы биоптатов и окрашенные гематоксилином и эозином.

Все случаи были разделены на 4 стадии по степени гистологической активности (табл. 2). К таким стадиям активности традиционно относят появление лейкоцитов в собственной пластинке слизистой (1-я степень), появление лейкоцитов в эпителии (2-я степень), формирование скоплений лейкоцитов в просвете крипт (3-я степень), разрушение крипт и покровного эпителия с формированием эрозий и язв (4-я степень активности). Полученные данные сравнили со степенями активности по шкале Гебоэса.

Проведенный анализ выявил различия в распределении степеней по шкале Гебоэса при разных нозологических формах колитов (рис. 1—5).

В группе ВЗК преобладали случаи умеренной (33/80 случаев ЯК и 30/57 случаев БК) и высокой активности (43/80 случаев ЯК и 21/57 случаев БК) (см. табл. 2). По шкале Гебоэса эти случаи относились к 4-й и 5-й степеням. Слабая степень активности/степень 3 по Гебоэсу наблюдалась в 4 случаях ЯК и в 6 случаях БК. Отсутствие случаев с минимальной гистологической активностью/стадия 2В по Гебоэсу свидетельствует о невозможности изолированного появления нейтрофильных лейкоцитов без поражения эпителия при ВЗК. Меньшее количество случаев с высокой гистологической активностью при БК можно связать с очаговостью поражения.

Инфекционный колит, при котором с помощью клинико-лабораторных методов были обнаружены бактери-

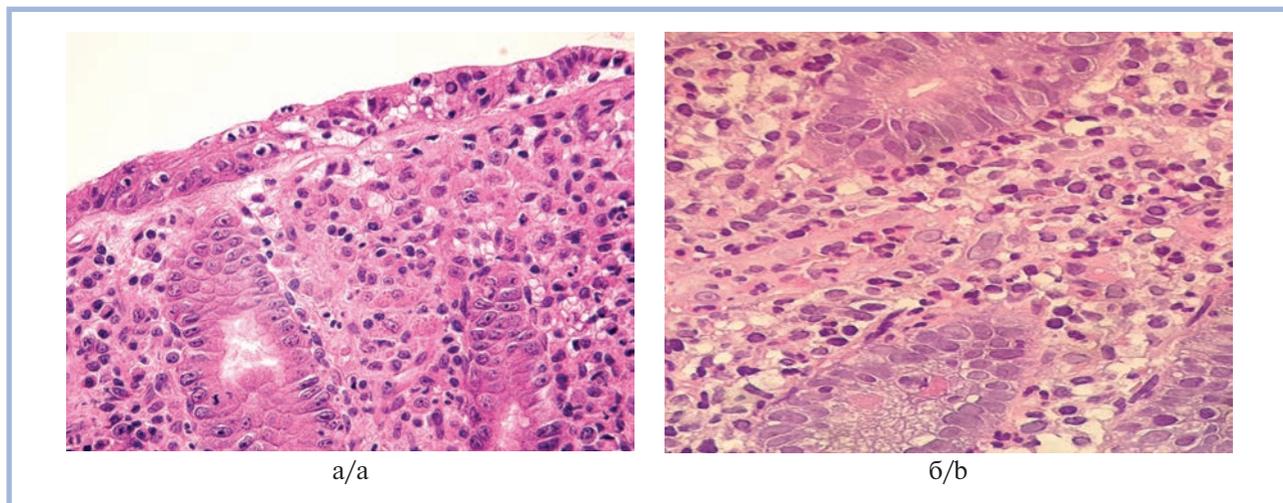


Рис. 1. Лекарственный колит.

а — в покровном эпителии обнаруживаются немногочисленные лейкоциты. Эпителий с регенераторными изменениями; б — появление нейтрофильных лейкоцитов в воспалительном инфильтрате собственной пластинки, лейкостазы в просвете капилляров. Минимальная степень активности, степень 2В.1 по шкале Гебоэса. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 1. Drug-induced colitis.

a — few leukocytes are found in the surface epithelium. Regenerative changes of the epithelium; b — neutrophils in the inflammatory infiltrate of lamina propria, leukostasis in the capillaries lumen. The minimum degree of activity. Grade 2B.1 on the Geboes Scale. H&E. $\times 200$.

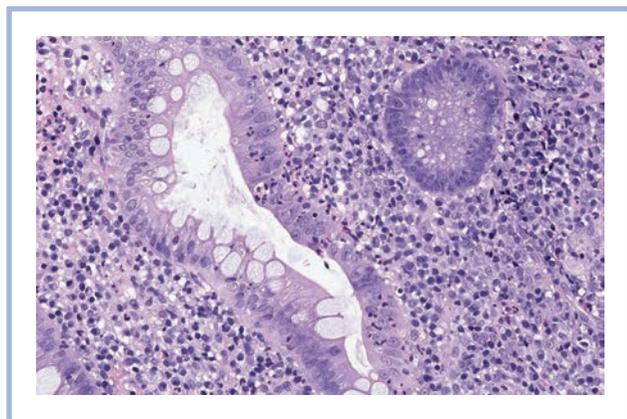


Рис. 2. Болезнь Крона.

Лейкоциты в эпителии крипт. Слабая степень активности. Степень 3.2 по шкале Гебоэса. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 2. Crohn's disease.

Leukocytes in the crypt epithelium. Low degree of activity. Grade 3.2 on the Geboes Scale. H&E. $\times 200$.

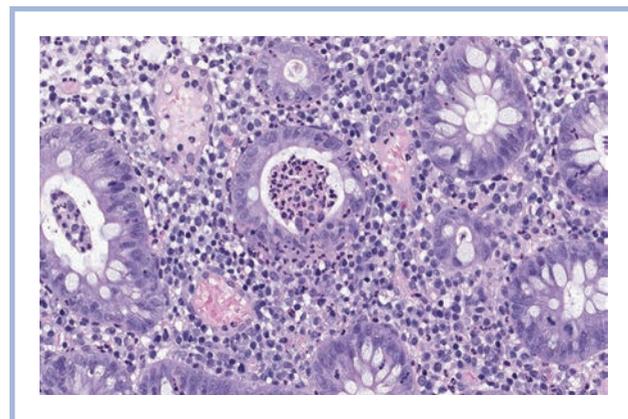


Рис. 3. Язвенный колит.

Формирование крипт-абсцессов. Умеренная степень активности. Степень 4.1 по шкале Гебоэса. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 3. Ulcerative colitis.

Crypt abscesses formation. Moderate degree of activity. Grade 4.1 on the Geboes Scale. H&E. $\times 200$.

альные возбудители кишечных инфекций (эшерихиоза, иерсиниоза, шигеллеза и сальмонеллеза) был представлен случаями с наличием всех степеней активности от минимальной (2/51) до выраженной (11/51) с преобладанием умеренной степени активности/степень 4 по Гебоэсу. Эти случаи составили более половины наблюдений (28/51).

Степень выраженности активности лекарственного колита непосредственно была связана с группами применявшихся лекарственных препаратов. Случаи умеренной и высокой гистологической активности были связаны с приемом противоопухолевых и цитостатических лекарственных препаратов (11/45).

Случаи ишемического колита характеризовались преимущественно минимальной и слабой гистологической активностью (10/12).

Во всех случаях лимфоцитарного колита преимущественно отмечалась минимальная гистологическая активность, что вполне согласуется с морфологической характеристикой этих форм колитов.

Псевдомембранозный антибиотик-ассоциированный колит с учетом деструктивных процессов и скоплениями фибринозно-лейкоцитарного экссудата всегда сопровождался высокой степенью активности воспаления.

Результаты нашего исследования показали, что при попытке выделить три степени гистологической активности

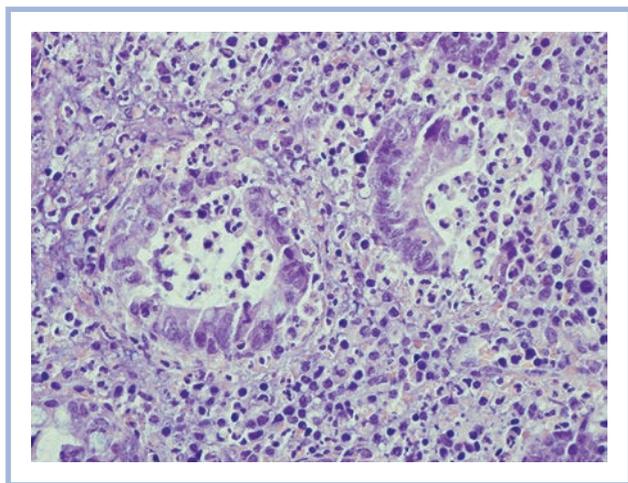


Рис. 4. Иерсиниозный колит.

Крипт-абсцессы и очаг деструкции с поврежденным эпителием и лейкоцитарной инфильтрацией (формирование эрозии). Высокая степень активности. Степень 4.3–5.1 по шкале Гебоэса. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 4. *Yersinia colitis*.

Crypt abscesses and a focus of destruction with damaged epithelium and leukocyte infiltration (erosion formation). High degree of activity. Grade 4.3–5.1 on the Geboes Scale. $\times 200$. H&E. $\times 200$.

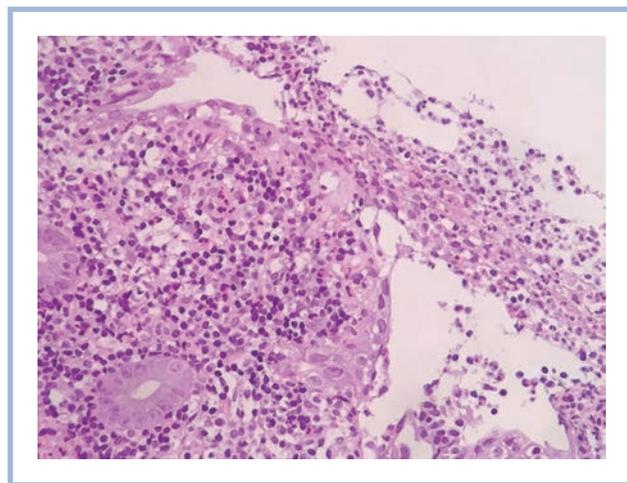


Рис. 5. Инфекционный колит, вызванный энтеропатогенной *E.coli*.

Образование поверхностной эрозии, покрытой лейкоцитарным экссудатом и окруженной регенерирующим эпителием (несомненная эрозия). Высокая степень активности. Степень 5.3 по шкале Гебоэса. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 5. *E.coli colitis*.

Formation of surface erosion covered with leukocyte exudate and surrounded by regenerating epithelium (unequivocal erosion). High degree of activity. Grade 5.3 on the Geboes Scale. H&E. $\times 200$.

большинство наблюдений оказались в группе с умеренной ее степенью. Поэтому логично предложить разделить гистологическую активность только на низкую и высокую степень активности. Основным принципом разграничения мы посчитали появление/наличие в биоптатах нейтрофильных лейкоцитов (низкая степень активности) и появление/наличие деструктивных изменений (высокая степень активности). Признаками высокой степени активности являлись: повреждение и некроз эпителия, разрушение крипт и участки с эрозированной поверхностью. По шкале Гебоэса это соответствует подстепеням 4.1 и 5.1.

Предлагая вышесказанное, мы опирались на существующую на сегодняшний день в мире тенденцию к разделению большинства процессов на две степени. Прежде всего эта тенденция проявилась в выделении двух степеней дисплазии (интраэпителиальной неоплазии) — высокой и низкой. Такая тенденция имеет свои весомые аргументы: улучшается воспроизводимость получаемых разными специалистами результатов и минимизируется влияние субъективных факторов на постановку окончательного патолого-анатомического диагноза.

Остается нерешенным вопрос о признаках минимальной активности. Некоторые авторы считают возможным не принимать во внимание обнаружение отдельных лейкоцитов в эпителии, так как подобные изменения, по их мнению, могут быть связаны с подготовкой к проведению эндоскопического исследования и, соответственно, иметь искусственный характер [11]. В своих заключениях мы такие случаи сопровождаем подробными комментариями. При обнаружении одновременно лейкоцитов в собственной пластинке и в просвете капилляров мы склонны трактовать их как проявление низкой активности с очаговыми минимальными воспалительными явлениями. Сложнее ситуация с обнаружением лейкоцитов в зоне скопления лимфоидной ткани и в прилежащих к лимфоидной ткани

криптах, содержащих отдельные лейкоциты. Подобные изменения могут быть проявлением инфекционного поражения с минимальными признаками активности или проявлением гиперплазии лимфоидной ткани, которая не обязательно может иметь инфекционный генез. О возможной двойкой трактовке подобных морфологических изменений следует информировать клиницистов.

Однако с учетом действующих рекомендаций эндоскописты придерживаются правила взятия материала при тяжелом язвенном поражении — из участка с наименьшими изменениями, а при незначительном поражении — из самого измененного. Такой подход изначально подразумевает получение усредненного результата.

Объективизации может способствовать оценка степени гистологической активности колита по результатам изучения всех биоптатов и степени распространенности лейкоцитарной инфильтрации. Достаточно близок к такому подходу подсчет, используемый в шкалах Райли и Робертса. Это достаточно трудоемкий процесс, опять же подверженный субъективизации из-за особенностей взятия материала при колоноскопии. Если брать биопсию из самых измененных участков слизистой оболочки, то в биоптатах обнаруживаются некротический детрит, скопления фибринозно-лейкоцитарного экссудата и фрагменты грануляционной ткани. Морфологически подтверждается тяжелый язвенный процесс и высокая активность. Однако характеристика структурных и воспалительных изменений невозможна.

Существует распространенное заблуждение, что обнаружение крипт-абсцессов свидетельствует в пользу ЯК. На самом деле они могут обнаруживаться и при других формах колитов, в частности, инфекционной и лекарственной природы.

Информация о степени гистологической активности крайне важна для принятия клинических решений. Гистологическая характеристика активности воспаления долж-

на быть отражена в патолого-анатомическом диагнозе. Она позволяет проводить сравнительную оценку клинической, эндоскопической и гистологической активности и лучше контролировать состояние пациента на фоне проводимого лечения.

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования — Х.М. Ахриева, Е.А. Коган, А.С. Тертычный, О.В. Зайратьянц

Сбор и обработка материала — А.С. Тертычный, Л.С. Селиванова

Написание текста — Х.М. Ахриева, А.С. Тертычный, С.Г. Раденска-Лоповок

Редактирование — С.Г. Раденска-Лоповок, О.В. Зайратьянц, Е.А. Коган

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Marchal Bressenot A, Riddell RH, Boulagnon-Rombi C, Reinisch W, Danese S, Schreiber S, Peyrin-Biroulet L. Review article: the histological assessment of disease activity in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(8):957-967. <https://doi.org/10.1111/apt.13375>
2. Salem MS, Melmed GY. The role of histology in determining disease activity, treatment, and prognosis: are we there yet? *Gastrointest Endosc Clin North Am.* 2019;29(3):437-446. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2019.02.010>
3. Jessurun J. The differential diagnosis of acute colitis: clues to a specific diagnosis. *Surg Pathol Clin.* 2017;10(4):863-885. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.07.008>
4. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: What does it mean? *Gut.* 1991;32(2):174-178. <https://doi.org/10.1136/gut.32.2.174>
5. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut.* 2000;47(3):404-409. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.404>
6. Mosli MH, Feagan BG, Sandborn WJ, D'haens G, Behling C, Kaplan K, Driman DK, Shackelton LM, Baker KA, Macdonald JK, Vandervoort MK, Geboes K, Levesque BG. Histologic evaluation of ulcerative colitis: A systematic review of disease activity indices. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(3):564-575. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000437986.00190.71>
7. Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C, Bastien C, Cahn V, Cadiot G, Diebold MD, Danese S, Reinisch W, Schreiber S, Travis S, Peyrin-Biroulet L. Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut.* 2017;66(1):43-49. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310187>
8. Mosli MH, Feagan BG, Zou G, Sandborn WJ, D'Haens G, Khanna R, Shackelton LM, Walker CW, Nelson S, Vandervoort MK, Frisbie V, Samaan MA, Jairath V, Driman DK, Geboes K, Valasek MA, Pai RK, Lauwers GY, Riddell R, Stitt LW, Levesque BG. Development and validation of a histological index for UC. *Gut.* 2017;66(1):50-58. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310393>
9. Villanacci V, Antonelli E, Lanzarotto F, Bozzola A, Cadei M, Bassotti G. Usefulness of different pathological scores to assess healing of the mucosa in inflammatory bowel diseases: A real life study. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07338-x>
10. Jauregui-Amezaga A, Geerits A, Das Y, Lemmens B, Sagaert X, Bessissow T, Lobatón T, Ferrante M, Van Assche G, Bisschops R, Geboes K, De Hertogh G, Vermeire S. A simplified Geboes Score for ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2017;11(3):305-313. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw154>
11. Pai RK, Jairath V, VandeCastele N, Rieder F, Parker CE, Lauwers GY. The emerging role of histologic disease activity assessment in ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc.* 2018;88(6):887-898. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2018.08.018>

Поступила 09.11.2021

Received 09.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Применение технологий секвенирования в педиатрической нейроонкологии

© К.В. ОКОНЕЧНИКОВ^{1–3}, М.В. РЫЖОВА³, С.А. ГАЛСТЯН³, Е.Н. ТЕЛЫШЕВА³

¹Hopp Children's Cancer Center Heidelberg (KiTZ), Хайдельберг, Германия;

²Division of Pediatric Neurooncology, German Cancer Research Center (DKFZ), Хайдельберг, Германия;

³ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Технологии секвенирования нового поколения за последнее 10-летие стали стандартным методом в исследованиях геномики злокачественных опухолей и постепенно выходят на новый этап — применение в клинической онкологии для улучшения диагностики и построения персонализированного лечения опухолей. Секвенирование позволяет прочитать геном и успешно используется для обнаружения мутаций и других соматических изменений — транслокаций, инверсий, вставок и делеций, вариантов числа копий, ведущих к развитию опухоли. При фокусе на транскриптом (систему активных генов) секвенирование позволяет четко определить различия в экспрессии генов, улучшить классификацию опухолей и выявить соматические химеры. Все эти возможности особенно актуальны для педиатрической онкологии ввиду существующих ограничений в лечении и потребности в самом точном выявлении ключевых факторов развития опухоли. В этой статье описаны технология секвенирования, ее применение на материалах опухолей мозга для улучшения диагностики и другие актуальные возможности, которые могут быть рассмотрены для прямого использования в медицине.

Ключевые слова: нейроонкология, секвенирование, ДНК, РНК, мутации, гены слияния.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Оконечников К.В. — <https://orcid.org/0000-0002-3409-2340>

Рыжова М.В. — <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>

Галстян С.А. — <https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>

Тельшева Е.Н. — <https://orcid.org/0000-0002-0370-8667>

Автор, ответственный за переписку: Рыжова М.В. — e-mail: mrizhova@nsi.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Оконечников К.В., Рыжова М.В., Галстян С.А., Тельшева Е.Н. Применение технологий секвенирования в педиатрической нейроонкологии. *Архив патологии*. 2022;84(2):58–63. <https://doi.org/10.17116/patol20228402158>

Application of high throughput sequencing in pediatric neurooncology

© K.V. OKONECHNIKOV^{1–3}, M.V. RYZHOVA³, S.A. GALSTYAN³, E.N. TELYSHEVA³

¹Hopp Children's Cancer Center Heidelberg (KiTZ), Heidelberg, Germany;

²German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany;

³NN Burdenko Neurosurgical Center, Moscow, Russia

ABSTRACT

Over the past decade, next generation sequencing (NGS) has become the standard method in research of cancer genomics; currently NGS is entering a new stage — direct usage in clinical oncology to improve diagnostics and establish personalized tumor treatments. NGS allows to read the genome and it is successfully applied to detect mutations and other somatic changes (translocations, inversions, insertions and deletions, copy number variants) leading to the development of a tumor. With a focus on transcriptome sequencing allows to clearly identify differences in gene expression, improve the classification of tumors and detect somatic chimeras. All these possibilities are especially relevant for pediatric neurooncology filed in view of the existing limitations in treatment and the need for the most accurate identification of the key factors of tumor development. In this article, we describe sequencing technology basis, its application on brain tumor materials to improve diagnostics, and other relevant possibilities that can be considered for direct usage in medicine.

Keywords: neurooncology, high throughput sequencing, DNA, RNA, mutations, fusion genes.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Okonechnikov K.V. — <https://orcid.org/0000-0002-3409-2340>

Ryzhova M.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>

Galstyan S.A. — <https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>

Telysheva E.N. — <https://orcid.org/0000-0002-0370-8667>

Corresponding author: Ryzhova M.V. — e-mail: mrizhova@nsi.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Okonechnikov KV, Ryzhova MV, Galstyan SA, Telysheva EN. Application of high throughput sequencing in pediatric neurooncology. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):58–63. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402158>

На данный момент опухоли мозга являются одними из самых критических заболеваний в мире ввиду сложности их лечения. Особенно опасны нейроонкологические заболевания в детском возрасте вследствие ограничений применения стандартных видов лечения, таких как радио- и химиотерапия, а также наличия возможных вторичных эффектов после стандартной терапии, негативно влияющих на дальнейшее развитие мозга [1].

Существует большое количество видов опухолей мозга, имеющих различия по своей локализации, скорости роста и другим свойствам. Более того, некоторые классы опухолей мозга также могут различаться внутри, распределяясь на подгруппы, и на данный момент наиболее актуальным стандартом является классификация опухолей центральной нервной системы от World Health Organization [2]. Ввиду большого количества и серьезных различий между видами опухолей мозга важный фактор для выбора оптимального лечения — четкое определение класса опухоли и выявление соматических изменений, ведущих к развитию опухоли. Стандартным методом в этой области является гистология, однако тут существует ряд технических сложностей и в том числе вариабельность в интерпретации результатов вследствие многообразности системы мозга. Более того, обычно в опухолях мозга у детей трудно выявить какие-либо четкие причины онкогенеза при некоторых классах таких опухолей, как, например, эпендимомы, до сих пор не определено наличие каких-либо ключевых мутаций, ведущих к развитию опухоли [3].

Для решения этих неординарных задач в настоящее время одним из самых перспективных ресурсов становится молекулярная биология. Большой шаг вперед в этой области был сделан после появления технологий секвенирования — систем, обеспечивающих получение и прочтение молекулярной информации из опухолевых клеток в больших объемах [4]. Эти системы позволяют выявить соматические изменения генома, ведущие к развитию опухоли, и построить транскриптомную или эпигеномную структуру опухоли, позволяющую четко ее классифицировать. Набранная из секвенирования информация выводит лечение опухоли на уровень персонализированной медицины с максимальной точностью диагностики и оптимальным выбором метода лечения.

Получение молекулярной информации, касающейся опухолей, при использовании секвенирования

Секвенирование за последние 10 лет стало стандартной процедурой в молекулярной биологии для изучения генома (полной последовательности ДНК из всех хромосом клетки) и транскриптома (совокупности активных РНК, синтезируемых клеткой). Первые попытки считывать последовательность ДНК были сделаны с помощью применения методов секвенирования по Сэнгеру, однако для этого надо изначально знать четкую локализацию нарушения в геноме для выбора праймеров, чтобы определить необходимую последовательность. Новые системы позволили полностью автоматизировать это процесс. На данный момент наиболее распространена методика секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS или High Throughput Sequencing, HTS), позволяющая параллельно считывать до 1 млн фрагментов ДНК. Стандартные шаги процедуры секвенирования включают:

- 1) фильтрацию материала, например, выделение определенных фрагментов ДНК или конвертация РНК в ДНК;
- 2) фрагментацию — разделение последовательностей ДНК на определенные размеры для возможности их прочтения и добавление адаптеров для фиксации, а также амплификацию созданных фрагментов для усиления сигнала;
- 3) считывание последовательностей фрагментов и сохранение в виде цифровых записей;
- 4) анализ полученных данных для выявления соматических изменений ДНК и других возможных факторов развития опухоли.

Для применения секвенирования минимальный лимит входных тканей опухоли варьирует от 50 до 200 нг [5]. Важно также отметить, что стандартное секвенирование требует высокого качества исходной ДНК. Поэтому были разработаны процедуры, позволяющие длительное время не только сохранять опухолевую ткань, но и извлекать из нее достаточное количество качественной ДНК. Например, выделение ДНК из образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином (Formalin-fixed paraffin-embedded), гарантирует успешное применение секвенирования с минимальной потерей качества после долгого хранения [6].

Наиболее широко используемые системы для секвенирования на данный момент производятся компанией Illumina. Такие платформы, как NextSeq500 или MiSeq500, полностью автоматизируют процедуру и на выходе выдают считанные фрагменты генома (прочтения, или риды), позволяющие выявить нуклеотидную последовательность вырезанного сегмента ДНК. Типичный размер рида составляет от 50 до 150 нуклеотидов. Для улучшения покрытия также применяются парные риды, когда фрагмент последовательности считывается с двух сторон. Типичный размер фрагмента может быть от 300 до 1000 нуклеотидов. Широкие фрагменты ДНК для парных ридов особенно полезны для выявления комплексных структурных изменений генома.

Важным этапом после получения данных секвенирования является их анализ. Особенно критично наличие вычислительных ресурсов, хранилища данных и автоматизации процедуры анализа, так как объем полученных данных может превышать сотни миллионов ридов. Ввиду того что геном человека уже известен (последняя версия GRCh38/hg38, ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.26), изначально риды выравниваются на последовательность этого генома, чтобы определить их локацию. Следует отметить, что каждый этап секвенирования может вносить технические ошибки и в результате последовательность рида может отличаться от изначально считанной последовательности ДНК. Начальный контроль качества позволяет выявить некорректные сегменты ридов и исключить их из дальнейшего анализа. Также важно учитывать, что для повышения точности полученного результата требуется иметь высокий уровень покрытия каждой позиции генома и это может потребовать увеличения количества ридов. Например, чтобы повысить точность выявления мутации для генома человека, необходимо минимальное покрытие до 40X ридов в каждой позиции, а в идеале до 100X [7]. Сложность полного покрытия также заключается в том, что малый размер рида даже с учетом парных фрагментов может вести к неточности определения локации в геноме из-за наличия повторов. Ряд специальных программ был разработан, чтобы скорректировать и оптимизировать выравнивание ридов на геном и избежать различных ошибок; некоторые из этих методов уже стали

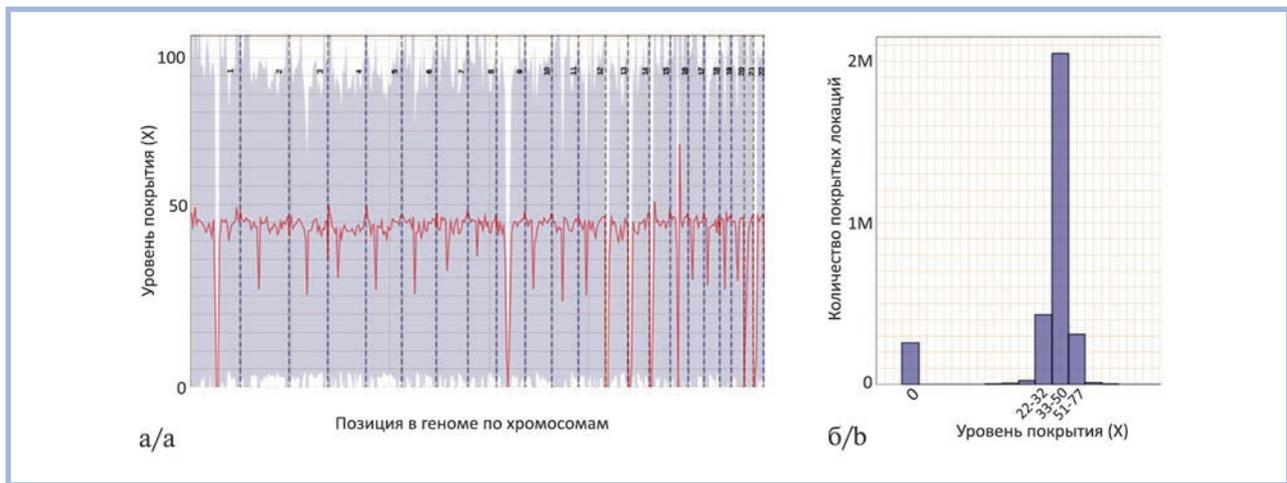


Рис. 1. Пример контроля качества данных полного геномного ДНК-секвенирования на образце рецидива эпендимомы. Анализ уровня покрытия генома по хромосомам (а) и гистограмма его распределения (б). Визуализация осуществлена с помощью инструмента контроля качества выравнивания ридов Qualimap.

Fig. 1. Example of quality control for the whole genome sequencing data from ependymoma relapse sample.

Genome coverage analysis per chromosome (a) and coverage histogram (b). Visualization is performed by the tool for the quality control of read alignments — Qualimap.

стандартными [8]. Однако полученные данные выравнивания ридов на геном также следует изучить детально для выявления возможных технических ошибок, например, низкое покрытие определенных участков генома или поврежденная фрагментация. Этот контроль качества также стал стандартным блоком анализа данных секвенирования с набором эффективных существующих программ [9], позволяющих выявлять возможные проблемы (рис. 1).

Полученные результаты выравнивания ридов на геном могут быть использованы для решения сложных задач, каждая из которых обладает своей спецификой. Далее в статье описываются типичные стратегии анализа данных ДНК и РНК в нейроонкологии.

ДНК-секвенирование

Секвенирование ДНК является важным этапом в онкологии, поскольку позволяет выявлять мутации, инверсии, вставки, удаления и сложные транслокации генома, ведущие к развитию опухоли. Наиболее оптимальный метод для решения данной задачи — полное секвенирование генома, осуществляющее покрытие всех его участков. Однако такая процедура может требовать довольно высоких финансовых расходов ввиду необходимости полного покрытия. Альтернативой может служить полное экзомное секвенирование участков генома, покрывающих только функциональные сегменты гена. Экзоны составляют лишь 2% генома, тем самым значительно уменьшают количество требуемых ридов для покрытия. Более того, экзоны могут также быть отфильтрованы на ряд генов, важных для изучения опухолей, при нацеленном секвенировании, еще более уменьшив требуемые ресурсы. Тем не менее принципиально учитывать, что такая фильтрация может привести к потере важной информации, так как из-за транслокаций могут быть соматически активны участки генома, непокрытые в выбранном методе секвенирования, например регионы между генами или хвосты хромосом.

ДНК-секвенирование применяется в основном в онкологии для определения мутаций — изменений генома, которые могут вести к развитию опухоли, как, например, хорошо изученные K27M- или G34R-мутации гена *H3F3A* в глиобластомах [10]. Такие мутации можно выявить при сравнении последовательностей ридов, полученных из опухоли с последовательностью нормального генома (рис. 2). Существует ряд широко используемых программных инструментов, позволяющих выполнить эту процедуру [11]. Кроме того, при помощи такого секвенирования также можно выявлять и более сложные изменения генома: вставки, удаления, дупликации и транслокации. Типичным примером такого соматического эффекта является делеция критического сегмента гена *CDKN2A* в глиобластомах [12] или сложная система транслокаций — хромотрипсис в медуллобластомах и эпендимоммах [13]. Как и для поиска мутаций, выявление таких соматических изменений осуществляется при использовании опубликованных и адаптированных методов [14].

Важно принимать во внимание, что в опухолях мозга могут отсутствовать какие-либо прямые изменения генома, особенно учитывая, насколько мало мутаций возникает в раннем возрасте. Несмотря на это, дополнительный эффект может быть выявлен при помощи проверки изменений копий генома. Так, некоторые онкогены могут сильно активироваться через амплификацию, как, например, транскрипционные факторы *MYC* и *MYCN* в группах 3 и 4 медуллобластомы [15]. Геномное/экзомное секвенирование также позволяет при анализе данных выявить такие эффекты. Как и с мутациями, существует ряд стабилизированных методов для достижения этой цели [16].

После выявления мутаций, вставок/удалений и транслокаций из данных секвенирования генома или экзона необходимо определить те изменения, которые могут давать серьезные эффекты дестабилизации нормальных клеток. Обширные библиотеки доступных данных можно использовать, чтобы аннотировать их, например, проверить локацию мутации в геноме и уточнить, какой участок гена

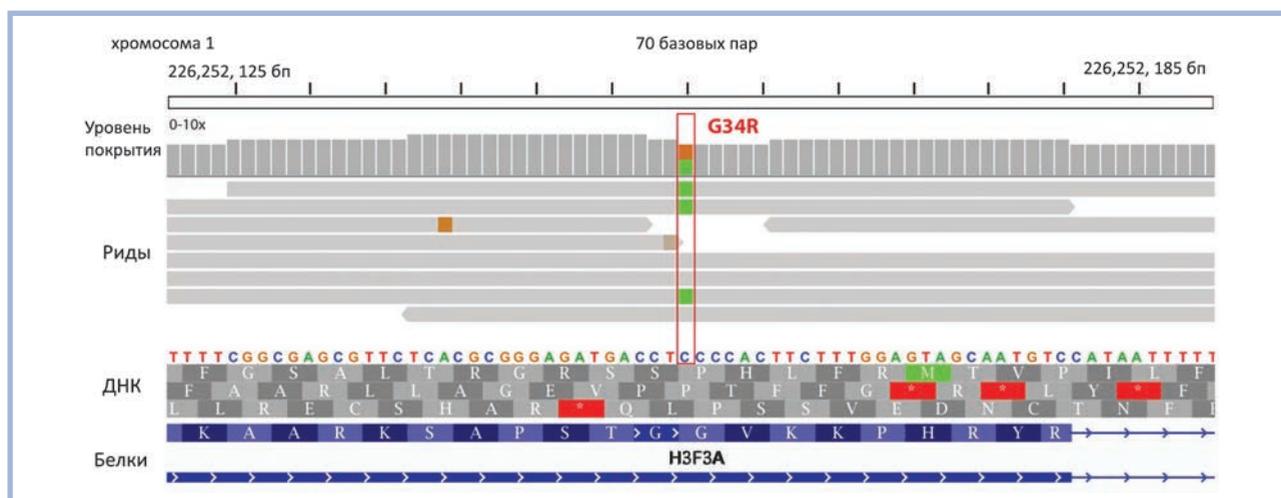


Рис. 2. Соматическая мутация, ведущая к изменению белка (G34R) в гене *H3F3A*, обнаруженная при анализе данных полного геномного секвенирования из образца глиомы.

Визуализация осуществлена с помощью инструмента Integrative Genomics Viewer.

Fig. 2. Somatic mutation leading to protein change (G34R) in *H3F3A* gene detected by the analysis of the whole genome sequencing from glioma tumor.

Visualization is performed by Integrative Genomics Viewer tool.

затронут и может ли он привести к функциональному изменению белка, есть ли подтверждение этой мутации как известного соматического изменения по существующим исследованиям злокачественных опухолей и др. Созданные для этой цели широко используемые ресурсы хорошо описаны и находятся в открытом доступе для применения [17].

Важно отметить, что найденные с помощью секвенирования мутации могут не давать никакого эффекта, связанного с развитием опухоли, но являются обычными возможными изменениями в геноме. Для четкого выявления значимости мутации требуется специальный контроль в виде нормального материала ДНК пациента, опухоль которого изучается (например, кровь). Нормальный материал также секвенируется, при этом мутации и транслокации опухоли сравниваются с результатами, полученными в контроле для выявления соматических изменений. Тем не менее требуется учитывать, что генетически заложенные так называемые наследственные мутации тоже могут играть важную роль. Некоторые виды опухолей мозга, например медуллобластома, имеют ассоциацию с синдромом Ли—Фраумени, обусловленным мутацией в гене *TP53* [18]. Дополнительная проверка выявленных в опухолях мутаций при существующем контроле специфичных генов позволит изучить эти эффекты.

Для финальной проверки результатов также обычно имеет смысл визуализировать результат. На данный момент существует ряд инструментов, которые помогают отобразить выбранный участок генома (например, ключевой поврежденный ген, как показано на **рис. 2**) с полной интеграцией данных секвенирования — покрытия, найденных мутаций и так далее. Визуализация позволяет выявить, насколько корректным является результат, а также изучить дополнительные детали. Есть как широкодоступные инструменты свободного доступа (пример, Integrative Genomics Viewer [19]), так и программы от коммерческих компаний с полной поддержкой, но требующих дополнительной оплаты (пример, CLC Genome Browser).

РНК-секвенирование

Применение РНК-секвенирования на материалах опухоли сходно с процедурой для ДНК по своим техническим деталям и отличается только по первому этапу: извлеченные из опухоли РНК конвертируются в ДНК, а также фильтруются для исключения избыточных генов (например, рибосомных). Полученные риды выравниваются на геном, интегрируя уже существующие и широко применяемые программы [20], и далее используются для оценки экспрессии генов после подсчета количества ридов, покрывающих их. Важно учитывать, что для контроля генов требуется использовать последнюю детальную аннотацию генома человека (например, Gencode 38, gencodegenes.org/human), а также, как и для геномного секвенирования, осуществлять дополнительный контроль качества выравнивания ридов, специфичный для РНК (например, выявление пропорции покрытых генов).

Полученная матрица экспрессии генов позволяет четко выявить наиболее активные или, наоборот, потерянные маркеры — ключевые гены, участвующие в развитии опухоли. Например, амплификацию *MYC/MYC* в группах 3—4 медуллобластомы также можно определить в данных РНК-секвенирования, используя их высокую экспрессию по сравнению с другими генами опухоли. Более того, полный материал экспрессии генов образца опухоли можно сравнить с различными доступными или опубликованными материалами других опухолей при кластеризации, чтобы подтвердить гистологическую классификацию опухоли или выявить возможные различия. Не менее важно, что выявление генов, активных в опухоли, позволит понять их коммуникацию и определить ключевые онтологические группы. Это может являться решающим фактором для выбора новейшего метода лечения, такого как контроль иммунной системы или деактивация определенного соматического гена через редактирование генома.

Однако наиболее значительной причиной применения РНК-секвенирования на материалах опухолей является

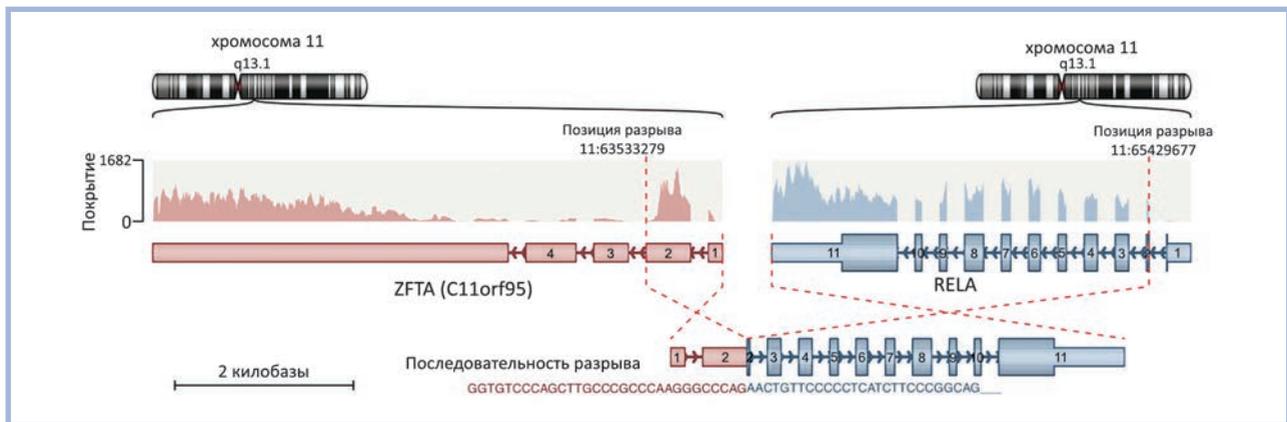


Рис. 3. Слияние генов ZFTA и RELA, выявленное в эпендимоме в результате использования РНК-секвенирования. Визуализация осуществлена как завершающий этап анализа данных с помощью инструмента для поиска химерных генов Arriba.

Fig. 3. Fusion ZFTA and RELA genes in ependymoma identified by RNA sequencing. Visualization is generated as additional final data processing step from the fusion calling tool Arriba.

возможность обнаружения генов слияния (fusion genes), или химер. Такие гены могут возникнуть при транслокации генома, приводящей к слиянию фрагмента одного гена с другим, т.е. к формированию нового гена с уникальными соматическими функциями. Хорошо известным примером такого гена является химера ZFTA-RELA в агрессивных эпендимомах (рис. 3), которая была доказана как основная причина развития опухоли [21]. Для выявления таких генов слияния были разработаны эффективные биоинформатические методы, уже широко используемые для уточнения классификации опухоли [22]. Тем не менее выявленные гены слияния могут потребовать дополнительной экспериментальной проверки. Наиболее удобным методом для этой цели может служить полимеразная цепная реакция (ПЦР) или секвенирование по Сэнгеру.

Важно отметить, что РНК-секвенирование также может быть скомбинировано с данными ДНК-секвенирования, полученными из материала той же самой опухоли. Это особенно полезно для подтверждения активной мутации в экспрессирующем гене в случае ее пропорционального различия в аллелях по данным, полученным из ДНК (например, на рис. 1 — G37R-мутация выражена только в одной аллели). Другой вариант комбинации — это выявление эффекта найденной в геноме транслокации, которая может вести к появлению гена слияния, как было указано выше.

Дополнительно визуализация ДНК- и РНК-результатов тоже может быть скомбинирована для улучшения интерпретации с помощью существующих и ранее отмеченных инструментов [19].

Заключение

В данный момент в онкологии секвенирование нового поколения как инструмент диагностики активно применяется в клинической практике. Однако всегда следует учитывать, что, несмотря на возможность выявления мутаций, структурных изменений генома и других важных соматических факторов, изучение материала опухоли требует полной комбинации всех доступных ресурсов, при этом важным шагом является корректная интеграция материалов секвенирования в полную систему диагностики опухоли на медицинском уровне.

В будущем секвенирование может стать стандартным дополнительным методом, позволяющим улучшить прогноз и выбрать наилучшую стратегию лечения пациента, что является важнейшим требованием в педиатрической нейронкологии.

Работа поддержана Грантом Минобрнауки РФ (номер соглашения 075-15-2021-1343).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chemaitilly W, Armstrong GT, Gajjar A, Hudson MM. Hypothalamic-pituitary axis dysfunction in survivors of childhood CNS tumors: importance of systematic follow-up and early endocrine consultation. *J Clin Oncol*. 2016;34(36):4315-4319. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.1847>
2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng H, Pfister SM, Reifenberger G, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
3. Thompson YY, Ramaswamy V, Diamandis P, Daniels C, Taylor MD. Posterior fossa ependymoma: current insights. *Child's Nerv Syst*. 2015;31(10):1699-1706. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2823-2>
4. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011;32(4):177-195.
5. Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ, Levitan D. Pre-analytical considerations for successful next-generation sequencing (NGS): challenges and opportunities for formalin-fixed

- and paraffin-embedded tumor tissue (FFPE) samples. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1579.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091579>
6. Greytak SR, Engel KB, Zmuda E, Casas-Silva E, Guan P, Hoadley KA, Mungall AJ, Wheeler DA, Doddapaneni HV, Moore HM. National Cancer Institute biospecimen evidence-based practices: harmonizing procedures for nucleic acid extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Biopreserv Biobank.* 2018; 16(4):247-250.
<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0046>
 7. Alioto TS, Buchhalter I, Derdak S, Hutter B, Eldridge MD, Hovig E, Heisler LE, Beck TA, Simpson JT, Tonon L, et al. A comprehensive assessment of somatic mutation detection in cancer using whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 2015;6:10001.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10001>
 8. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
 9. García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Götz S, Tarazona S, Dopazo J, Meyer TF, Conesa A. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics.* 2012;28(20):2678-2679.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>
 10. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang D-AK, Tönjes M, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012;482(7384):226-231.
<https://doi.org/10.1038/nature10833>
 11. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):213-219.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2514>
 12. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, del Carmen Patino M, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Taberner MD, et al. Molecular and genomic alterations in glioblastoma multiforme. *Am J Pathol.* 2015;185(7):1820-1833.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.023>
 13. Ernst A, Jones DT, Maass KK, Rode A, Deeg KI, Jebaraj BMC, Korshunov A, Hovestadt V, Tainsky MA, Pajtler K., et al. Telomere dysfunction and chromothripsis. *Int J Cancer.* 2016;138(12):2905-2914.
<https://doi.org/10.1002/ijc.30033>
 14. Rausch T, Zichner T, Schlattl A, Stütz AM, Benes V, Korbel JO. DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics.* 2012;28(18):333-339.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts378>
 15. Roussel MF, Robinson GW. Role of MYC in medulloblastoma. *Cold Spring Harbor Perspect Med.* 2013;3(11):a014308.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014308>
 16. Whitford W, Lehnert K, Snell RG, Jacobsen JC. Evaluation of the performance of copy number variant prediction tools for the detection of deletions from whole genome sequencing data. *J Biomed Inform.* 2019;94:103174.
<https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103174>
 17. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-423.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
 18. Rausch T, Jones DT, Zapatka M, Stütz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, Jäger N, Remke M, Shih D, Northcott PA, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell.* 2012;148(1-2):59-71.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.013>
 19. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-26.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
 20. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
 21. Zheng T, Ghasemi DR, Okonechnikov K, Korshunov A, Sill M, Maass KK, da Silva PBG, Ryzhova M, Gojo J, Stichel D, et al. Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas. *Cancer Discov.* 2021;11(9):2230-2247.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0963>
 22. Uhrig S, Ellermann J, Walther T, Burkhardt P, Fröhlich M, Hutter B, Toprak UH, Neumann O, Stenzinger A, Scholl C, Fröhling S, Brors B. Accurate and efficient detection of gene fusions from RNA sequencing data. *Genome Res.* 2021;31(3):448-460.
<https://doi.org/10.1101/gr.257246.119>

Поступила 10.12.2021

Received 10.12.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Профилирование экспрессии генов в диагностике меланомы: проблемы и перспективы

© Н.В. ПАЛКИНА, Т.Г. РУКША, В.А. ХОРЖЕВСКИЙ, Е.Ю. СЕРГЕЕВА, Ю.А. ФЕФЕЛОВА

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

РЕЗЮМЕ

К проблемам диагностики и дифференциальной диагностики меланомы кожи в работе врача-патологоанатома относятся не только противоречивые структурно-морфологические особенности, но и недостаточная эффективность биохимических и некоторых молекулярных маркеров при иммуногистохимическом исследовании. В обзоре приведены современные аспекты оценки злокачественных новообразований на основе характеристики экспрессии генов, производительность, объективность и надежность определения которых может в перспективе иметь клиническое применение в качестве дополнения к гистопатологическим методам в диагностике и дифференциальной диагностике разных злокачественных новообразований, в том числе и меланоцитарных, что меняет парадигму рутинной медицинской практики, внедряя в нее диагностические тесты, несущие молекулярную информацию.

Ключевые слова: меланома, диагностика, молекулярные маркеры, профилирование экспрессии генов.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Палкина Н.В. — <https://orcid.org/0000-0002-6801-3452>

Рукша Т.Г. — <https://orcid.org/0000-0001-8142-4283>

Хоржевский В.А. — <https://orcid.org/0000-0002-9196-7246>

Сергеева Е.Ю. — <https://orcid.org/0000-0002-2089-6022>

Фефелова Ю.А. — <https://orcid.org/0000-0001-5434-7155>

Автор, ответственный за переписку: Рукша Т.Г. — e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Палкина Н.В., Рукша Т.Г., Хоржевский В.А., Сергеева Е.Ю., Фефелова Ю.А. Профилирование экспрессии генов в диагностике меланомы: проблемы и перспективы. *Архив патологии*. 2022;84(2):64–71. <https://doi.org/10.17116/patol20228402164>

Gene expression profiling in melanoma diagnostics: problems and future application in clinical practice

© N.V. PALKINA, T.G. RUKSHA, V.A. KHORZHEVSKII, E.Yu. SERGEEVA, Yu.A. FEFELOVA

Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

ABSTRACT

Difficulties in the diagnosis and differential diagnosis of melanoma in the work of a pathologist include not only conflicting structural and morphological features, but also the insufficient effectiveness of biochemical and some molecular markers in immunohistochemical studies. The review presents modern alternative methods for diagnosing malignant tumors based on the assessment of gene expression, the performance, objectivity and reliability of the determination of which may in the future have clinical application as an addition to histopathological methods in the diagnosis and differential diagnosis of various malignant neoplasms, including melanocytic neoplasms, which is changing the paradigm of routine medical practice, introducing diagnostic tests that carry molecular information into it.

Keywords: melanoma, diagnosis, molecular markers, gene expression profiling.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Palkina N.V. — <https://orcid.org/0000-0002-6801-3452>

Ruksha T.G. — <https://orcid.org/0000-0001-8142-4283>

Khorzhevskii V.A. — <https://orcid.org/0000-0002-9196-7246>

Sergeeva E.Yu. — <https://orcid.org/0000-0002-2089-6022>

Fefelova Yu.A. — <https://orcid.org/0000-0001-5434-7155>

Corresponding author: Ruksha T.G. — e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Palkina NV, Ruksha TG, Khorzhevskii VA, Sergeeva EYu, Fefelova YuA. Gene expression profiling in melanoma diagnostics: problems and future application in clinical practice. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):64–71. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402164>

Современное состояние морфологической диагностики меланомы кожи

В настоящее время гистологическое исследование, совершаемое врачом-патологоанатомом, считается золотым стандартом диагностики и дифференциальной диагностики меланоцитарных новообразований. Вместе с этим, согласно результатам ряда исследований, от 8 до 20% анализируемых пигментных новообразований расцениваются врачами-патологоанатомами как неоднозначные, что указывает на необходимость дальнейшего совершенствования диагностики меланоцитарных новообразований кожи [1]. К факторам, обуславливающим наличие спорных вопросов как в отношении меланомы кожи, так и некоторых других злокачественных опухолей, относится не только характер субъективной оценки разными специалистами, но и широкий диапазон структурно-морфологических признаков, связанных в том числе с разнообразием молекулярных подтипов новообразований [2]. Кроме того, сохраняется ряд вопросов к прогностической и диагностической ценности иммуногистохимического метода в отношении некоторых видов меланоцитарных новообразований при оценке на основе данного метода уровня пролиферации клеток, характера иммунного ответа или изменений внутриклеточных сигнальных каскадов [3, 4].

Проблемы морфологической диагностики меланомы затрагивают не только вопросы дифференциации с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями, но и с другими злокачественными новообразованиями. При гистологическом исследовании меланома способна имитировать структурно-морфологические особенности широкого спектра опухолей, в частности, некоторых лимфом, низкодифференцированной карциномы, опухолей нейроэндокринного генеза [5]. Это связано с тем, что по своим цитологическим характеристикам клетки меланомы достаточно вариабельны и могут иметь широкий спектр морфологических черт — от эпителиоидных до веретенообразных. Это обусловлено особенностями цитоплазмы опухолевых клеток, придающей им светло-

клеточные, плазмцитоподобные, рабдоидные, перстневидные и другие черты. Кроме того, имеются данные, указывающие на возможность клеток меланомы частично или полностью подвергаться различным видам дифференцировки — шванновской, фибробластической, миофибробластической, рабдоидной, остеонной, хондронной, ганглиозной и гладкомышечной [5].

Иммуногистохимические и молекулярно-биологические методы в диагностике меланомы кожи

Для решения вышеуказанных проблем диагностики меланомы в работе врача-патологоанатома существуют вспомогательные инструменты, основанные на идентификации отдельных молекул-маркеров посредством иммуногистохимического исследования. В частности, в клинической практике используется иммуногистохимическая идентификация белка S100, представляющего собой кислый кальцийсвязывающий белок массой 21 кД, имеющий ядерную локализацию в клетке. Чувствительность позитивного окрашивания на данный маркер при меланоцитарных новообразованиях составляет 97—100%, однако при столь высоком значении чувствительности S100 характеризуется низкой специфичностью, что обусловлено экспрессией данного белка в клетках нервной оболочки, миоэпителиальных клетках, адипоцитах, хондроцитах, клетках Лангерганса, а также клетках целого ряда карцином и сарком [6—11]. В связи с этим обстоятельством рекомендован ряд дополнительных высокоспецифичных для меланомы (95—100%) иммуногистохимических маркеров для параллельной оценки наряду с S100, к которым относятся: белок HMB45 (рис. 1, а), имеющий чувствительность в диапазоне 69—93% (77—100% при первичных меланомах, 56—83% при метастатических), MART-1/Мелан-А с чувствительностью 75—92%, тирозиназа (рис. 1, б) — 84—94%, а также MITF и NKI/C3, уровень чувствительности которых 81—100 и 86—100% соответственно [3]. Кроме того, описаны и другие маркеры для дифференциальной диагностики меланоцитарных новообразований — это MUM-1,

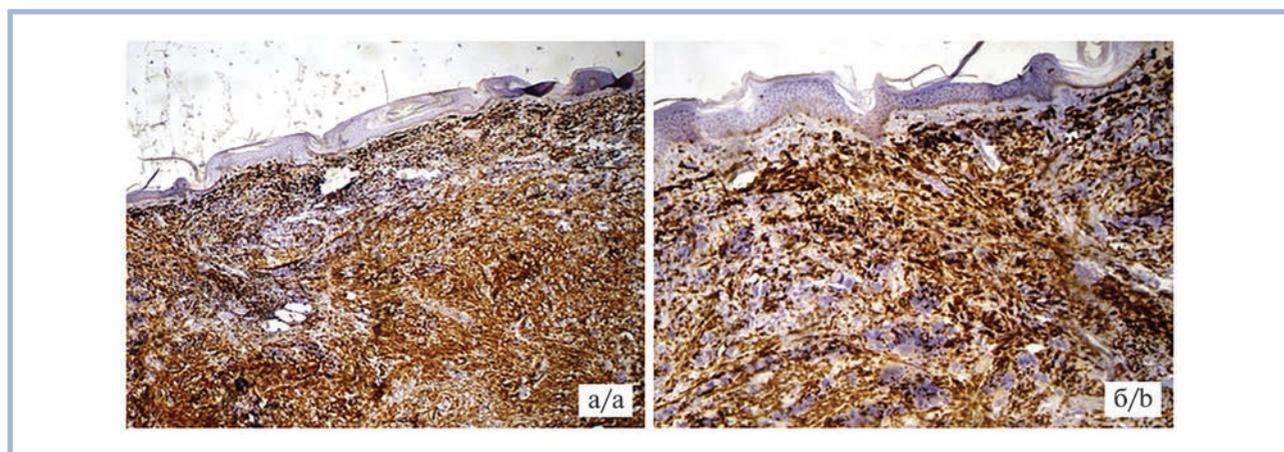


Рис. 1. Экспрессия HMB-45 и тирозиназы в меланоме.

а — иммуногистохимическая реакция с антителами HMB-45, $\times 100$; б — иммуногистохимическая реакция с антителами к тирозиназе, $\times 200$.

Fig. 1. Immunovisualization of HMB-45 and tyrosinase in melanoma.

а — immunohistochemical reaction with HMB-45, $\times 100$; immunohistochemical reaction with tyrosinase, $\times 200$.

меланокортин-1 и SM5-1, но ни один из них еще не продемонстрировал существенных преимуществ и не является строго специфичным, а потому эти молекулы не получили широкого клинического применения [12].

Наряду с дифференциальной диагностикой меланомы иммуногистохимический метод применяется для определения прогностических факторов, которые представляют маркеры клеточной пролиферации Ki-67 (рис. 2, а, б) и PCNA (рис. 2, в, г). Экспрессия данных белков является предиктором неблагоприятного прогноза для пациентов, она связана с более низкой выживаемостью, так как положительно коррелирует с такими морфологическими показателями, как толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление, лимфоваскулярная инвазия, количество митозов [13, 14]. Ki-67 в отличие от PCNA обладает наилучшей индивидуальной чувствительностью и специфичностью, хотя имеются сообщения о неоднозначных результатах использования обоих маркеров [15–17]. Описаны попытки применения в дифференциальной диагностике 5-hmC (5-гидроксиметилцитозин), экспрессия которого снижается при меланоме по сравнению с диспластическими невусами, кератиноцитами и лимфоцитами. Показатели чувствительности и специфичности такого дифференциально-диагностического метода составляют 92,7 и 97,7% соответственно, однако сообщается, что приведенные характеристики чувствительности и специфичности опре-

деления 5-hmC также недостаточны для использования данной молекулы в качестве единственного анализируемого маркера [18].

Учитывая обозначенные выше проблемы, сохраняется потребность в эффективных альтернативных маркерах диагностики и дифференциальной диагностики меланомы для использования в рутинной практике, учитывающих множество вариантов развития и прогрессии опухоли, которые в конечном итоге лежат в основе формирования вне- и внутриопухолевой гетерогенности.

В отношении неморфологических методов, обладающих перспективными характеристиками для диагностики меланомы кожи или применяющихся в клинической практике с целью прогнозирования течения и исхода заболевания, сообщается об оценке уровня белка PMEL (также называемого SILV, gp100 или ME20M) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в ткани свежемороженых биоптатов, где уровень его экспрессии значительно ниже в клетках меланомы по сравнению с меланоцитарными невусами [19]. Безусловно, в данном аспекте следует отметить и определение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови в качестве прогностического фактора меланомы, а также исследование мутационного статуса протоонкогена *BRAF*, являющегося предиктором терапевтического ответа при *BRAF*-позитивных меланоммах [20]. Однако

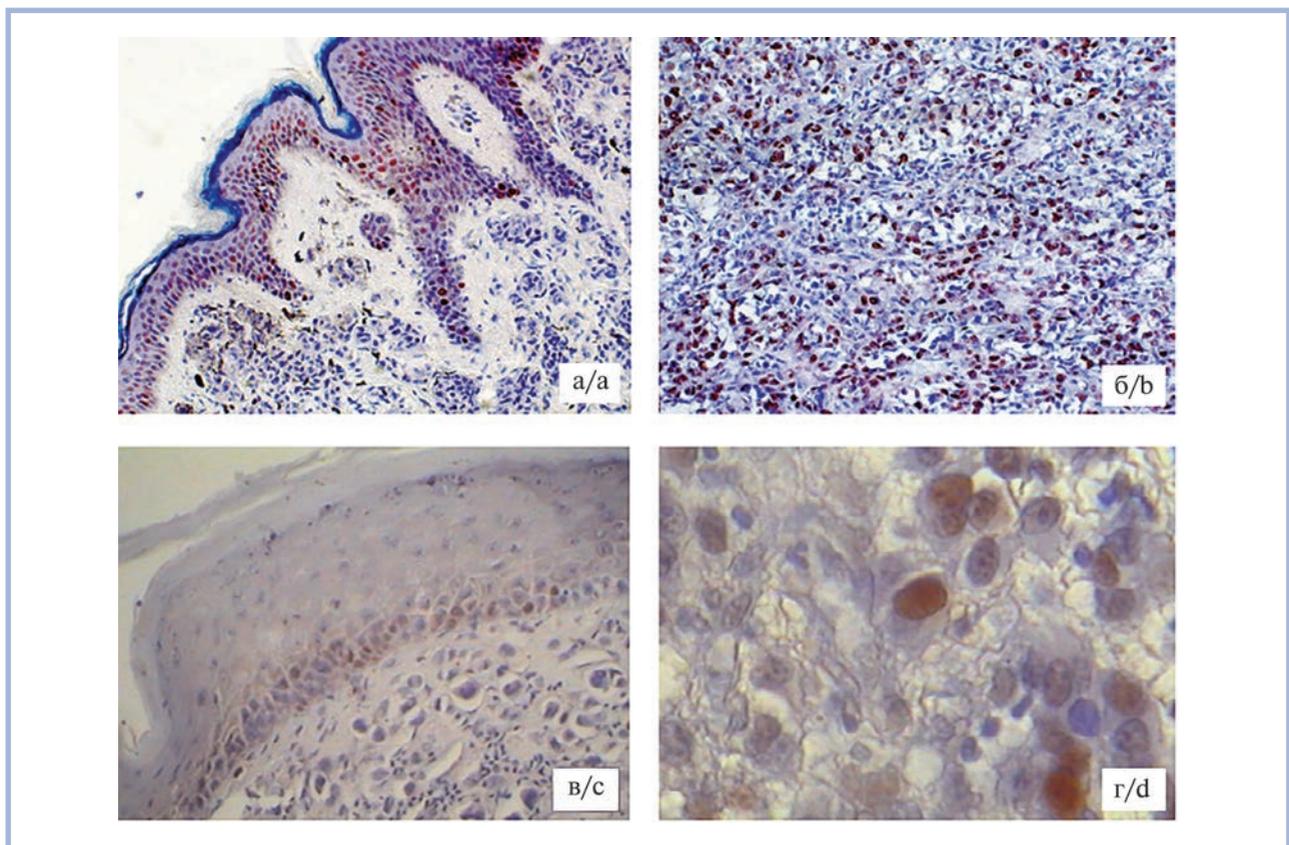


Рис. 2. Результаты иммуногистохимического исследования невуса и меланомы.

а — экспрессия Ki-67 в ткани невуса, $\times 100$; б — экспрессия Ki-67 в меланоме, $\times 200$; в — экспрессия PCNA в меланоме, $\times 200$; г — экспрессия PCNA в меланоме, $\times 400$.

Fig. 2. Immunovisualization of Ki-67 and PCNA.

а — Ki-67 expression in nevi, $\times 100$; б — Ki-67 expression in melanoma, $\times 200$; в — expression of PCNA in melanoma, $\times 200$; г — expression of PCNA in melanoma, $\times 400$.

до сих пор не выделено абсолютно эффективного молекулярного и/или биохимического диагностического маркера в этой области.

Применение анализа профилирования экспрессии генов в практической онкологии

В последние десятилетия были достигнуты значительные достижения в технологии секвенирования ДНК и РНК, генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов, количественной оценки матричных и некодирующих РНК, анализа молекулярных путей, а также получены значительные успехи в области интегративной биоинформатики. Новые знания значительно расширили понимание молекулярных основ возникновения и прогрессирования опухолей, индивидуального ответа пациентов на лечение.

Для определения молекулярных фенотипов опухолей в современных исследованиях используются различные технологии профилирования экспрессии генов (рис. 3). Благодаря современным молекулярно-генетическим подходам стало возможным провести изучение полного профиля РНК, кодируемого геномом отдельной клетки в специфическое время или в специфических условиях, а также исследовать совокупность всех транскриптов РНК, продуцируемых геномом, — кодирующих: рибосомальных,

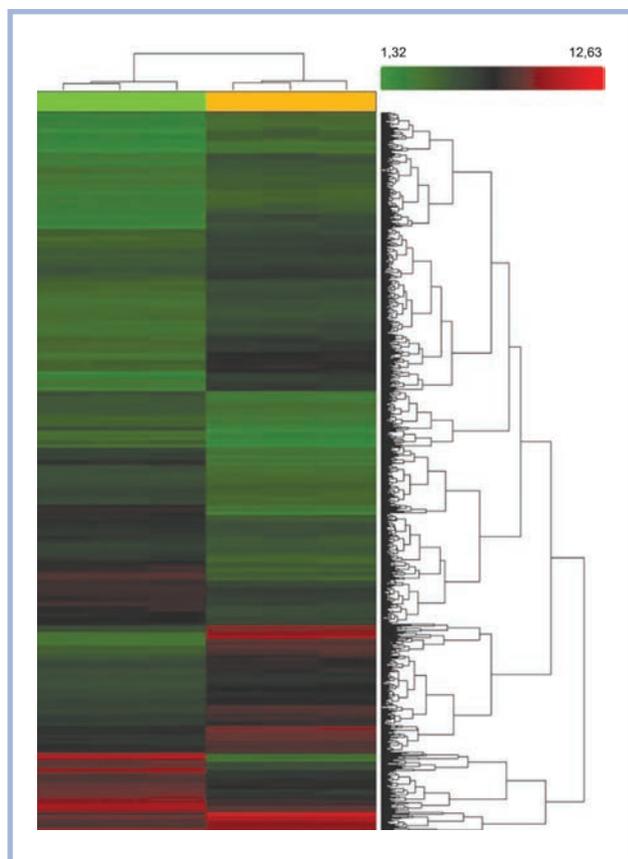


Рис. 3. Иерархическая кластеризация результатов экспрессии генов в двух различных типах клеток меланомы кожи.

Fig. 3. Hierarchical clustering of gene expression results in two different types of melanoma cells.

матричных или информационных, транспортных и ядерных, а также не кодирующих РНК, являющихся регуляторами экспрессии генов, к которым относятся микроРНК, малые интерферирующие, малые ядерные, малые ядрышковые и другие РНК.

Профилирование экспрессии генов имеет особо важное значение, так как способствует более глубокому пониманию ключевых биологических функций и раскрытию молекулярных механизмов, связывающих генетическую информацию, что, в свою очередь, помогает комплексно осмыслить патогенетические механизмы, лежащие в основе развития онкологических заболеваний [21].

Наиболее часто для профилирования экспрессии генов используются методы, в основе которых лежит микрочипирование (микроэррей) и секвенирование [22]. При микрочипировании происходит гибридизация инкубируемых флуоресцентно-меченных образцов нуклеиновых кислот с изготовленными на заказ либо готовыми микрочипами. Методы микрочипирования имеют ряд особенностей, в частности, необходимость существующей базовой информации о последовательности генома, неоднозначность интерпретации данных, обусловленная перекрестной гибридизацией, ограничения динамического диапазона детекции вследствие фона и насыщенности сигналов, а также необходимость использования методов нормализации результатов для получения достоверных данных о сравнительной экспрессии различных генов [23]. При заборе образцов следует учитывать, что для микрочипирования хорошо подходят биологические материалы, содержащие большое количество РНК, например, кровь, и нет необходимости разделения на фракции, а для секвенирования РНК рекомендовано использовать биопсийный материал релевантных тканей, а образцы подвергать сепарации на клеточные подтипы [24]. При секвенировании общее количество РНК фрагментируется, затем осуществляются синтез комплементарной ДНК и составление библиотеки генов с картированием референсных генов и дальнейшим анализом результатов, позволяющим выявить уровни экспрессии всех имеющихся генов во всей анализируемой ткани [25].

Благодаря разработкам в области геномных, транскриптомных и других технологий больших данных стало возможно исследовать не только совокупные молекулярные характеристики опухолей, но и, сопоставляя данные с клинико-морфологическими характеристиками, стадией заболевания, ответом на лечение, определять диагностическую и клиническую значимость выявленных молекулярных характеристик [26]. Такие совокупные молекулярные характеристики иногда именуют сигнатурами экспрессии генов. По определению сигнатура экспрессии гена — это определенная группа генов, коррелирующих генетические изменения с конкретными клиническими переменными, такими как диагноз или прогноз [27]. В последние годы исследователями было разработано и предложено множество сигнатур экспрессии генов, которые могут быть использованы в качестве классификации типов различных опухолей, для установления их стадий и, что немаловажно, прогноза заболевания, так как именно прогностические сигнатуры могут помочь врачу реализовать персонализированный подход к пациенту и подобрать верную терапевтическую стратегию [28].

Совсем недавно тесты профилирования экспрессии генов начали применять в клинической практике для определения того, какие пациенты с ранней стадией эстрогензависимого рака молочной железы и отсутствием метаста-

тического поражения лимфатических узлов нуждаются в адьювантной химиотерапии. Результаты данных тестов определяют риски рецидива опухоли и позволяют пациентам с низким риском избежать возможного ненужного лечения и краткосрочных и долгосрочных побочных эффектов, связанных с химиотерапией. Используется несколько коммерчески доступных тестов — Oncotype DX, Prosigna (PAM50), EndoPredict и MammaPrint, произведенных компанией Genomic Health Inc. (Калифорния) [29].

Первым из этих анализов был создан тест профилирования генов MammaPrint, разработанный Нидерландским институтом рака, он базируется на определении 70 генов, что позволяет выделить пациенток с раком молочной железы, имеющих высокий риск развития метастазов в течение 5 лет с момента постановки диагноза. Тест проводится с использованием метода профилирования экспрессии генов на основе микрочипирования на образцах свежей либо архивной ткани (замороженная ткань, биоптаты, заключенные в парафин) [30, 31].

Данный тест был одобрен к применению Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов FDA (от англ. Food and Drug Administration) в 2007 г. [32]. Также этот тест в качестве прогностического диагностического инструмента рекомендован Европейским обществом медицинской онкологии ESMO (European Society of Medical Oncology) и Американским объединенным комитетом по раку AJCC (American Joint Committee Cancer) [33].

Тест Oncotype DX представляет собой коммерчески доступную сигнатуру из 21 гена (включая 5 контрольных генов) на основе ОТ-ПЦР, которая проводится на образцах тканей, заключенных в парафиновые блоки. По результатам данного диагностического теста пациента можно отнести к какой-либо группе — низкого, промежуточного либо высокого риска в зависимости от риска отдаленного метастазирования через 10 лет. Этот тест был включен в качестве прогностического анализа в рекомендации Европейского общества медицинской онкологии ESMO (European Society of Medical Oncology), Национальной всеобщей онкологической сети NCCN (National Comprehensive Cancer Network) и Американского общества клинической онкологии ASCO (American Society of Clinical Oncology) [33].

PAM50 — это тест на основе микрочипирования, в котором используется 50 оцениваемых генов и 5 контрольных. Исследование проводится на биопсийном материале, фиксированном в формалине и заключенном в парафин [30].

EndoPredict включает анализ на основе 8 генов, связанных с канцерогенезом, и 3 эталонных генов. Его прогностическая ценность заключается в том, что этот анализ может быть использован при принятии решения о необходимости назначения адьювантной химиотерапии при раке молочной железы [34, 35].

Помимо рака молочной железы в настоящее время тесты на основе экспрессии генов, одобренные FDA, разработаны и используются и для других видов злокачественных новообразований. Такими диагностическими системами являются FoundationOne CDx (Foundation Medicine Inc., США) на основе секвенирования нового поколения для детекции в циркулирующих в крови молекулах ДНК, изменений в 311 генах, связанных с раком предстательной железы, немелкоклеточным раком легкого, раком яичников и раком молочной железы [36]; PROGENSA PCA3 (Gen-Probe Inc., США) — анализ на основе определения экспрессии мРНК генов *PCA3* и *PSA* в моче для принятия решения

о повторной биопсии при подозрении на рак предстательной железы у мужчин старше 50 лет [37]; BRACAnalysis CDx (Myriad Genetics, США) — диагностическая система, предназначенная для качественного обнаружения при помощи ПЦР патологических генотипов *BRCA1* и *BRCA2* с использованием геномной ДНК, полученной из образцов цельной крови, результаты данного теста при идентификации пациентов с раком предстательной железы, яичников и молочной железы [38].

Профилирование экспрессии генов при меланоме кожи

Для меланомы кожи также существует некоторый пласт накопленных данных о генных совокупностях, выявленных на основе различных методов полного профилирования и имеющих определенные характеристики, в первую очередь полезные для дифференциальной диагностики, а во вторую — имеющие прогностический потенциал. Так, определена экспрессионная совокупность, состоящая из 23 генов, позволяющая отличать меланому кожи от доброкачественных пигментных новообразований с чувствительностью 90% и специфичностью 91%, которые были подтверждены на независимой клинической когорте из 437 образцов [39]. Позднее исследовательская группа J.S. Ко и соавт. [40] оценила точность данной сигнатуры на когорте из 99 меланом, которые метастазировали после первоначального диагноза, и 83 невусов при длительном безрецидивном наблюдении. С помощью указанной сигнатуры успешно дифференцированы эти поражения с чувствительностью 93,9% и специфичностью 96,2%. Также при экспрессионном анализе РНК с использованием метода секвенирования 204 первичных опухолей меланомы была идентифицирована еще одна генная совокупность, состоящая из 121 гена, связанная с метастазированием, которая идентифицирует пациентов с меланомой, имеющих более высокий риск развития такого вида опухолевой прогрессии [41].

Производительность, объективность и надежность определения сигнатур экспрессии генов могут иметь клиническое применение в качестве дополнения к гистопатологическим методам в диагностике и дифференциальной диагностике разных злокачественных новообразований, в том числе и меланоцитарных новообразований, что меняет парадигму рутинной медицинской практики, внедряя в нее диагностические тесты, несущие молекулярную информацию. Но прежде чем этот новый вспомогательный диагностический медицинский инструмент получится внедрить в клинические условия, как, например, это было предпринято в отношении прогностических тестов для рака молочной железы, описанных в данной статье, необходимо будет решить многие оставшиеся без ответа вопросы, касающиеся получения образцов, стратегий нормализации результатов исследований и т.д. [42]. Например, международная коалиция экспертов по меланоме сообщила, что для рандомизированного клинического исследования, оценивающего дополнительную ценность биомаркеров, основанных на прогностической экспрессии генов, потребуются когорты в количестве 1000–9000 пациентов в зависимости от дизайна исследования и проверяемой гипотезы [43].

Таким образом, существуют определенные ограничения в применении современных высокотехнологичных методов диагностики и лечения, в известной

степени обеспечивающих минимально радикальное воздействие на пациента с онкологическим заболеванием [44]. Тем не менее интеграция такого рода инструментов уже успешно осуществляется в отношении меланомы кожи. Так, при выборе тактики лечения метастатической формы этого заболевания, согласно последним практическим рекомендациям Российского общества клинической онкологии, рекомендуется молекулярно-генетическое исследование опухоли с целью выявления *BRAF*-мутации, а при ее отсутствии — молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах *NRAS* (экзон 3) и *KIT* (экзоны 8, 9, 11, 13, 14, 17, 18), что определяет выбор дальнейшей терапевтической стратегии [45].

Особенности получения и хранения биологических образцов с целью диагностики новообразований на основе оценки профиля экспрессии генов

Так или иначе, за последние несколько десятилетий достижения молекулярной медицины уже изменили характер диагностики и лечения злокачественных опухолей, поскольку новые молекулярные тесты способны не только дополнять, но и во многих случаях превосходить традиционные методы дифференциальной диагностики, а также определять прогноз для пациента и ответ на варианты лечения. В этом аспекте стоит отдельно затронуть проблему получения и хранения биологических образцов в виде биопсийного материала от пациентов.

Замораживание биопсийной ткани пациента с последующим хранением при температуре -80°C является более предпочтительным методом для тестов на основе молекулярного профилирования, поскольку этот способ обеспечивает высокий выход и высокое качество нуклеиновых кислот и белков, с которым не может сравниться широко распространенный метод фиксации в формалине с последующим заключением в парафин (FFPE, от англ. Formalin Fixation Paraffin Embedding) [46]. До настоящего времени получение замороженных тканей было в основном прерогативой исследовательских программ, но с внедрением

новых технологий, подобных описанным в данной статье, такое явление может стать обычным в клинической практике. Ткани, замороженные при сверхнизкой температуре (от -80 до -190°C) и ткани, фиксированные в формалине с заключением в парафин, имеют свои преимущества и недостатки: гистология замороженной ткани часто достаточна для обеспечения качества, хотя и уступает ткани FFPE для детального микроскопического анализа. Однако в отличие от ткани FFPE ДНК и РНК из замороженных биоптатов, как правило, имеют высокую молекулярную массу и не имеют негативных молекулярных модификаций от действия формальдегида, поэтому подходят для широкого спектра целей [47]. При сверхнизких температурах такие образцы могут храниться от нескольких лет до десятилетий, однако исследования выявили фрагментацию РНК уже через 5 лет, несмотря на хранение при -70°C или -80°C [48]. Однако криохранилище имеет не только указанные преимущества, но и недостатки: во многих медицинских центрах нет соответствующего персонала или надлежащей инфраструктуры для осуществления криохранения, биомолекулы могут деградировать с увеличением циклов замораживания-оттаивания, а затраты на хранение замороженных образцов намного выше, чем для образцов FFPE [46]. Для решения такого рода проблем разработаны растворы, которые могут служить возможной альтернативой криоконсервации, позволяющие сохранять стабильность молекул РНК и ДНК в ткани при комнатной температуре длительное время, однако сохраненная таким образом ткань не подходит для гистологического исследования. Кроме того, продолжаются исследования, необходимые для надлежащей проверки и подтверждения эффективности сохранения широкого спектра транскриптов мРНК и микроРНК при использовании РНК-стабилизирующих растворов [49].

Персонализированная медицина становится стандартом медицинской помощи во всем мире, а разработки в области молекулярного профилирования, геномного анализа и открытия новых методов диагностики и лекарственной терапии на основе этих методов являются вектором улучшения показателей выживаемости пациентов и качества жизни.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№проекта 19-15-00110).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shoo BA, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma at a melanoma referral center. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(5):751-756. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.09.043>
2. Ferrara G, Misciali C, Brenn T, Cerroni L, Kazakov DW, Perasole A, Russo R, Ricci R, Crisman G, Fanti PA, Passarini B, Patrizi A. The impact of molecular morphology techniques on the expert diagnosis in melanocytic skin neoplasms. *Int J Surg Pathol*. 2013;21(5):483-492. <https://doi.org/10.1177/1066896913491323>
3. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*. 2008;35(5):433-444. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x>
4. Cockerell CJ, Tschien J, Evans B, Bess E, Kidd J, Kolquist KA, Rock C, Clarke LE. The influence of a gene expression signature on the diagnosis and recommended treatment of melanocytic tumors by dermatopathologists. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(40):e4887. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004887>
5. Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology*. 2000;36(5):387-402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00894.x>
6. Bishop PW, Menasce LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology*. 1993;23(2):159-166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1993.tb00474.x>
7. Fernando SS, Johnson S, Bäte J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NK1/C3 monoclonal antibody. *Pathology*. 1994;26(1):16-19. <https://doi.org/10.1080/00313029400169021>

8. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol*. 1998;11(8):740-746.
9. Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, Takahashi R, Nagai T, Yoshida M, Suzuki F, Obikane H, Yamashina M, Matsubayashi J. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem*. 2012;45(5):269-282. <https://doi.org/10.1267/ahc.12019>
10. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016;20(6):436-443. <https://doi.org/10.5114/wo.2016.56938>
11. Carter CS, East EG, McHugh JB. Biphenotypic sinonasal sarcoma: A review and update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(10):1196-201. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0207-RA>
12. Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(6):13-24. <https://doi.org/10.1080/00313029400169021>
13. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol*. 2006;19(suppl 2):71-87. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800517>
14. Udovicic-Gagula D, Ahmovic A, Bilalovic N, Doric M. Expression of Ki-67 and estrogen receptor beta in primary cutaneous melanoma as a potential indicator of regional lymph node positivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(1):27-32. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000530>
15. Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA. p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol*. 1998;25(6):291-296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1998.tb01748.x>
16. Henrique R, Azevedo R, Bento MJ, Domingues JC, Silva C, Jerónimo C. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(6):991-1000. <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.109282>
17. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, Marcorelles P. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol*. 2015;10:195. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0431-9>
18. Rodić N, Zampella J, Sharma R, Burns KH, Taube JM. Diagnostic utility of 5-hydroxymethylcytosine immunohistochemistry in melanocytic proliferations. *J Cutan Pathol*. 2015;42(11):807-14. <https://doi.org/10.1111/cup.12564>
19. Alexandrescu DT, Kauffman CL, Jatko TA, Hartmann DP, Vener T, Wang H, Derecho C, Rajpurohit Y, Wang Y, Palma JF. Melanoma-specific marker expression in skin biopsy tissues as a tool to facilitate melanoma diagnosis. *J Invest Dermatol*. 2010;130(7):1887-92. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.61>
20. Deacon DC, Smith EA, Judson-Torres RL. Molecular biomarkers for melanoma screening, diagnosis and prognosis: current state and future prospects. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:642380. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.642380>
21. Aldridge S, Teichmann SA. Single cell transcriptomics comes of age. *Nat Commun*. 2020;11(1):4307. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18158-5>
22. Chu C, Fang Z, Hua X, Yang Y, Chen E, Cowley AW Jr, Liang M, Liu P, Lu Y. deGPS is a powerful tool for detecting differential expression in RNA-sequencing studies. *BMC Genomics*. 2015;16(1):455. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1676-0>
23. Royce TE, Rozowsky JS, Gerstein MB. Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(15):e99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm549>
24. Perscheid C, Grasnack B, Uflacker M. Integrative gene selection on gene expression data: providing biological context to traditional approaches. *J Integr Bioinform*. 2018;16(1):20180064. <https://doi.org/10.1515/jib-2018-0064>
25. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
26. Qian Y, Daza J, Itzel T, Betteg J, Zhan T, Marmé F, Teufel A. Prognostic cancer gene expression signatures: current status and challenges. *Cells*. 2021;10(3):648. <https://doi.org/10.3390/cells10030648>
27. Chibon F. Cancer gene expression signatures — the rise and fall? *Eur J Cancer*. 2013;49(8):2000-2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.02.021>
28. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015;4(3):256-269. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04>
29. Smith A, Farrah K. *Gene expression profiling tests for breast cancer: a rapid qualitative review*. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; April 18, 2019.
30. Rosa M. Advances in the molecular analysis of breast cancer: pathway toward personalized medicine. *Cancer Control*. 2015;22(2):211-219. <https://doi.org/10.1177/107327481502200213>
31. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011;378(9805):1812-1823. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61539-0)
32. Schmidt C. Mammprint reveals who can skip chemotherapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(8):djw197. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw197>
33. Güler EN. Gene expression profiling in breast cancer and its effect on therapy selection in early-stage breast cancer. *Eur J Breast Health*. 2017;13(4):168-174. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2017.3636>
34. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Menel RG, Van Poznak C, Bast RC, Hayes DF. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1134-1150. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.2289>
35. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevela P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-6020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>
36. Woodhouse R, Li M, Hughes J, Delfosse D, Skoletsky J, Ma P, Meng W, Dewal N, Milbury C, Clark T, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One*. 2020;15(9):e0237802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237802>
37. Sartori DA, Chan DW. Biomarkers in prostate cancer: what's new? *Curr Opin Oncol*. 2014;26(3):259-264. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000065>
38. Sekine M, Nishino K, Enomoto T. BRCA genetic test and risk-reducing salpingo-oophorectomy for hereditary breast and ovarian cancer: State-of-the-Art. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11):2562. <https://doi.org/10.3390/cancers13112562>

39. Clarke LE, Warf MB, Flake DD 2nd, Hartman AR, Tahan S, Shea CR, Gerami P, Messina J, Florell SR, Wenstrup RJ, et al. Clinical validation of a gene expression signature that differentiates benign nevi from malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. 2015;42(4):244-252.
<https://doi.org/10.1111/cup.12475>
40. Ko JS, Matharoo-Ball B, Billings SD, Thomson BJ, Tang JY, Sarin KY, Cai E, Kim J, Rock C, Kimbrell HZ, et al. Diagnostic distinction of malignant melanoma and benign nevi by a gene expression signature and correlation to clinical outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(7):1107-1113.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0958>
41. Garg M, Couturier DL, Nsengimana J, Fonseca NA, Wongchenko M, Yan Y, Lauss M, Jönsson GB, Newton-Bishop J, Parkinson C, et al. Tumour gene expression signature in primary melanoma predicts long-term outcomes. *Nat Commun*. 2021;12(1):1137.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21207-2>
42. Mazumder A, Wang Y. Gene-expression signatures in oncology diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2006;7(8):1167-1173.
<https://doi.org/10.2217/14622416.7.8.1167>
43. Grossman D, Okwundu N, Bartlett EK, Marchetti MA, Othus M, Coit DG, Hartman RI, Leachman SA, Berry EG, Korde L, et al. Prognostic gene expression profiling in cutaneous melanoma: identifying the knowledge gaps and assessing the clinical benefit. *JAMA Dermatol*. 2020;156(9):1004-1011.
<https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2020.1729>
44. Боженко В.К., Харченко Н.В., Запиров Г.М., Кудинова, Е.А., Троценко И.Д. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при пролиферативных заболеваниях органов репродуктивной системы. *Вестник Российского научного центра рентгенодиагностики Минздрава России*. 2012;2:12-16. Ссылка активна на 10.11.21.
- Bozhenko VK, Kharchenko NV, Zapirov GM, Kudinova EA, Trotsenko ID. Gene expression profile as a prognostic factor in proliferative diseases of reproductive system. *Journal of Radiology and Nuclear Medicine=Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii Minzdrava Rossii*. 2012;(2):12-16. (In Russ.). Accessed 10.11.2021.
https://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots_v12.htm
45. Моисеенко В.М., ред. Лекарственное лечение злокачественных опухолей. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации Российского общества клинической онкологии. (Спецвыпуск)*. М.: Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии»; 2020;656. Moiseenko VM, ed. Drug treatment of malignant tumors. *Malignant tumors: Practical recommendations of the Russian Society of Clinical Oncology. (Special issue)*. М.: All-Russian public organization «Russian Society of Clinical Oncology»; 2020;656. (In Russ.).
46. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV, Singer EJ, Cloughesy TF, Yong WH. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biopsies in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem*. 2014;47(4-5):258-266.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
47. Tang W, Hu Z, Muallem H, Gulley ML. Quality assurance of RNA expression profiling in clinical laboratories. *J Mol Diagn*. 2012;14(1):1-11.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.09.003>
48. Leonard S, Logel J, Luthman D, Casanova M, Kirch D, Freedman R. Biological stability of mRNA isolated from human post-mortem brain collections. *Biol Psychiatry*. 1993;33(6):456-466.
[https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90174-c](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90174-c)
49. Williams MA. Stabilizing the code-methods to preserve RNA prove their worth. *Biomark Insights*. 2010;5:139-143.
<https://doi.org/10.4137/BMI.S6094>

Поступила 11.11.2021

Received 11.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Итоги работы Центра контроля качества иммуногистохимических исследований ФГБОУ ДПО «РМАНПО» за 2019—2021 гг.

© Л.Э. ЗАВАЛИШИНА, А.И. ВАСИЛЬЕВА, О.А. КУЗНЕЦОВА, К.А. СКРЫПНИКОВА, Г.А. ФРАНК

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

РЕЗЮМЕ

В 2019—2021 гг. Центр контроля качества иммуногистохимических исследований ФГБОУ ДПО «РМАНПО» провел раунды по наиболее применяющимся маркерам рака различных локализаций. Выявлены недостатки в проведении иммуногистохимических исследований и показана важность участия медицинских организаций в мероприятиях для улучшения контроля качества иммуногистохимических исследований в онкоморфологии.

Ключевые слова: иммуногистохимия, контроль качества.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Завалишина Л.Э. — <https://orcid.org/0000-0002-0677-7991>

Васильева А.И. — e-mail: Anna.I.Vasilyeva@yandex.ru

Кузнецова О.А. — <https://orcid.org/0000-0002-9721-6355>

Скрыпникова К.А. — e-mail: skrypnikova@yandex.ru

Франк Г.А. — <https://orcid.org/0000-0002-3719-5388>

Автор, ответственный за переписку: Завалишина Л.Э. — e-mail: zavalishina1@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Завалишина Л.Э., Васильева А.И., Кузнецова О.А., Скрыпникова К.А., Франк Г.А. Итоги работы Центра контроля качества иммуногистохимических исследований ФГБОУ ДПО «РМАНПО» за 2019—2021 гг. *Архив патологии*. 2022;84(2):72–76. <https://doi.org/10.17116/patol20228402172>

Results of the work of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education Center for quality control of immunohistochemical studies for 2019—2021

© L.É. ZAVALISHINA, A.I. VASILYEVA, O.A. KUZNETSOVA, K.A. SKRYPNIKOVA, G.A. FRANK

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

ABSTRACT

In 2019—2021 the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education Center for quality control of immunohistochemical studies conducted rounds on the most used tumour markers of various localizations. The deficiencies in the conduct of immunohistochemical studies were identified and the importance of the participation of medical organizations in measures to improve the quality control of immunohistochemical studies in oncomorphology was shown.

Keywords: immunohistochemistry, quality control.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Zavalishina L.É. — <https://orcid.org/0000-0002-0677-7991>

Vasilyeva A.I. — e-mail: Anna.I.Vasilyeva@yandex.ru

Kuznetsova O.A. — <https://orcid.org/0000-0002-9721-6355>

Skrypnikova K.A. — e-mail: skrypnikova@yandex.ru

Frank G.A. — <https://orcid.org/0000-0002-3719-5388>

Corresponding author: Zavalishina L.É. — e-mail: zavalishina1@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Zavalishina LÉ, Vasilyeva AI, Kuznetsova OA, Skrypnikova KA, Frank GA. Results of the work of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education Center for quality control of immunohistochemical studies for 2019—2021. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(2):72–76. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20228402172>

В 2018 г. по инициативе и активной поддержке Минздрава России на базе ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России был создан Центр контроля качества иммуногистохимических (ИГХ) исследований.

ИГХ-исследования в настоящее время являются неотъемлемой частью патолого-анатомического исследования особенно в дифференциальной диагностике онкологических заболеваний. Помимо диагностических целей

это исследование позволяет выявлять наличие показаний к адекватной таргетной терапии и иммунотерапии. Это, безусловно, определяет важность проведения данного вида исследования с качеством, необходимым для диагностики и дальнейшего выбора правильной тактики лечения согласно принятым клиническим рекомендациям Минздрава России.

ИГХ-исследование уже более 20 лет является рутинным в практической работе патологоанатомов, но стандартизация ИГХ-методов остается сложной проблемой особенно в связи с постоянным внедрением в практическую работу новых маркеров и методических подходов. Процесс внутрилабораторного контроля качества ИГХ-исследований не всегда выявляет ошибки/ неточности в протоколах, использование которых в диагностике показывает результаты, непригодные для использования в клинической практике.

По данным системы контроля качества Северной Европы NordiQC в настоящее время существует более 14,3 млн вариантов протоколов ИГХ-исследований, что делает невозможным выбор протокола на основе только внутрилабораторного контроля качества [1].

Системы внешнего контроля качества ИГХ-исследований существуют во многих странах мира, это не только локальные системы, но и системы, в которых могут принимать участие лаборатории различных стран [2]. Однако участие в зарубежных системах контроля качества сопряжено с логистическими проблемами обмена контрольными биоматериалами с зарубежными центрами. На этапе подготовки создания российской системы качества ИГХ-исследований были проведены пилотные раунды при методической поддержке NordiQC и при участии одного из ведущих экспертов этой системы Сорена Нильсена (Soeren Nielsen). Эта система и была взята за образец при создании отечественной системы контроля качества, что позволило в 2018 г. провести первый регулярный раунд по маркерам рака молочной железы (рецепторы эстрогенов — ER и HER2), в котором участвовали 24 медицинских учреждения России. По результатам раунда 12% участников показали неудовлетворительные результаты, которые не могли быть использованы в клинической практике [3].

В настоящее время ФГБОУ ДПО «РМАНПО» создан сайт Центра контроля качества (ihccqc.rmapo.ru). На сайте отражены этапы создания центра, принципы работы, представлены эксперты, сотрудничающие с центром, общие итоги каждого раунда, образец типового договора, принципы оценки образцов, реестр свидетельств об успешном

прохождении раунда. Каждый участник раунда после регистрации на сайте заводит личный кабинет, в котором также регистрируется и может видеть динамику изменения показываемых результатов за все время участия в программе контроля качества, подает протокол, по которому будет проводить окрашивание, а после заседания совета экспертов получает свой индивидуальный результат и индивидуальные рекомендации. Реестр свидетельств об успешном прохождении раунда по каждому маркеру также доступен на сайте Ассоциации онкологов России (АОР) и Российского общества клинической онкологии (RUSSCO).

Для участия в раунде медицинская организация заполняет заявку, вносит свой протокол исследования по маркерам, заявленным для контроля в каждом раунде, заключает договор с ФГБОУ ДПО «РМАНПО». Центр контроля качества обеспечивает с помощью курьерской службы обмен эталонными образцами с участниками раунда. Совет экспертов коллегиально оценивает присланные материалы и дает индивидуальные рекомендации каждому участнику. В целях обеспечения непредвзятости и объективности оценки для экспертов все участники анонимны, а участникам эксперты конкретного раунда неизвестны. Это является одним из базовых и неизменных принципов работы Центра контроля качества ИГХ-исследований.

В 2019 г. было проведено 2 раунда по маркерам рака молочной железы (ER, HER2, Ki-67), в которых приняла участие 41 медицинская организация. На каждом стекле, высланном участнику, было смонтировано по одному срезу с мультиблока, состоящему из 5 эталонных образцов тканей. Мультиблоки включали как образец нормальной ткани с выраженной экспрессией маркера, так и образцы опухолевой ткани с различными вариантами уровня экспрессии данного маркера от отрицательного до интенсивного [4].

По результатам этих раундов 15% участников показали отрицательные результаты по всем маркерам, 20% — по двум маркерам из трех (рис. 1).

Эксперты коллегиально оценивали препараты согласно следующим критериям:

- оптимально. Отсутствие недостатков и соответствие принятым в мире стандартам идеального окрашивания;
- хорошо. Имеется ряд небольших недостатков, не мешающих правильной постановке диагноза;
- погранично. Имеются недостатки, не позволяющие отличить истинный сигнал от сильного фона, отмечены перекрестные реакции, значительные артефакты;

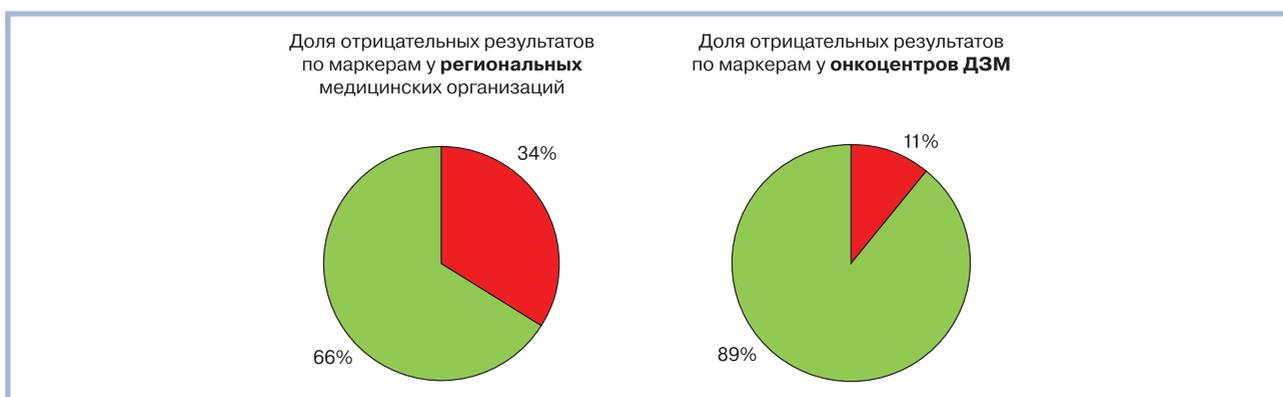


Рис. 1. Итоги раундов «Рак молочной железы» (маркеры ER, HER2, Ki-67) 2019 г.

Fig. 1. Results of rounds «Breast cancer» (markers ER, HER2, Ki-67) 2019.

— плохо. Наблюдаются ложноположительные или ложноотрицательные реакции хотя бы в одном образце.

Препараты с оценкой погранично и плохо не могут быть использованы в клинической практике.

При оценке препаратов, окрашенных антителами различных клонов к рецепторам эстрогенов, были выставлены следующие оценки: оптимально — 53,57%, хорошо — 7,14%, погранично — 10,72%, плохо — 28,57%.

Таким образом, только 60,71% участников получили результаты, которые подлежат использованию в клинической практике. Наибольшие проблемы возникли у участников, использовавших клон антител 6F11. В большинстве случаев эти участники не получали позитивного окрашивания в образцах опухолей со слабой интенсивностью экспрессии рецепторов эстрогенов, что в рутинной диагностической практике может приводить к ошибкам определения молекулярного подтипа рака молочной железы и, как следствие, к назначению неадекватного лечения.

Оценка препаратов, окрашенных антителами к HER2, показала, что оптимальное окрашивание получили 64,29% участников раунда, хорошо — 14,29%, погранично — 10,71% и плохо — 10,71%, т.е. 78,58% лабораторий получили результаты исследований, которые можно применять в клинической практике. Большинство участников для данного маркера использовали готовые закрытые наборы и протоколы постановки реакции, что, безусловно, повлияло на большое количество положительных оценок.

При оценке препаратов, окрашенных антителами к Ki-67, эксперты оценивали процент и локализацию окрашенных ядер клеток в сравнении с контрольными образцами. Лаборатории-участники получили следующие оценки: оптимально — 50%, хорошо — 14,29%, погранично — 28,57%, плохо — 7,14%.

Данные результаты показали, что только 64,29% лабораторий могут использовать свои результаты в клинической практике. Для такого маркера это особенно важно, так как определение экспрессии Ki-67 проводится с диагностической целью для большого количества опухолей, при этом ошибочное определение уровня экспрессии Ki-67 для некоторых нозологий, например лимфопролиферативных заболеваний, может привести к неверному диагнозу и неадекватному лечению.

Наибольшие проблемы с этим маркером возникли у участников, применявших клон MM1, для которого было отмечено значительное снижение уровня экспрессии

белка Ki-67, выявляемого при использовании данного клонна. Совет экспертов рекомендовал лабораториям сменить его на другой, зарегистрированный в РФ с соответствующей обработкой протокола.

В 2020—2021 гг. также было проведено 3 раунда по маркерам рака молочной железы. Участвовали региональные медицинские организации и многопрофильные онкологические центры Департамента здравоохранения г. Москвы. Отрицательные результаты по всем маркерам показали 9% участников. Более 30% региональных медицинских организаций, участвовавших в этих раундах, получили результаты, непригодные для использования в клинической практике. Необходимо отметить, что 6 многопрофильных онкологических центров Департамента здравоохранения Москвы, регулярно участвующих в контроле качества, показывают процент положительных результатов в 3 раза выше по сравнению с региональными медицинскими учреждениями (рис. 2).

Непрерывно растущая заболеваемость раком легкого показала актуальность проведения раундов по маркерам рака легкого (ALK, TTF1, PD-L1). Эти маркеры применяются и в дифференциальной диагностике (TTF1), и для определения чувствительности пациентов к таргетной и иммунотерапии (ALK и PD-L1). В 2019 г. был проведен 1 раунд (12 участников) и в 2020—2021 гг. — 2 раунда (18 участников). В этих раундах 16% участников показали отрицательные результаты по всем маркерам и 11% — по двум маркерам из трех. Результаты показали, что не менее 25% онкологических диспансеров и окружных больниц, принявших участие в раунде, проводят исследования с качеством, не позволяющим использовать эти результаты в лечебной работе. Сравнение с результатами 6 онкологических центров Департамента здравоохранения г. Москвы показывает, что в них положительные результаты выше в 3,5 раза по сравнению с региональными (рис. 3).

Раунд 2021 г. по маркерам лимфопролиферативных заболеваний (14 участников) показал, что 7% участников продемонстрировали отрицательные результаты по всем маркерам и 7% — по двум из трех. Можно отметить, что результаты, продемонстрированные онкологическими центрами Департамента здравоохранения Москвы, значительно превосходят таковые региональных медицинских учреждений (рис. 4).

В 2021 г. были проведены закрытые раунды для московских онкологических больниц по маркерам рака кишки (panCK, CK20, CDX2) и маркерам нейроэндокрин-

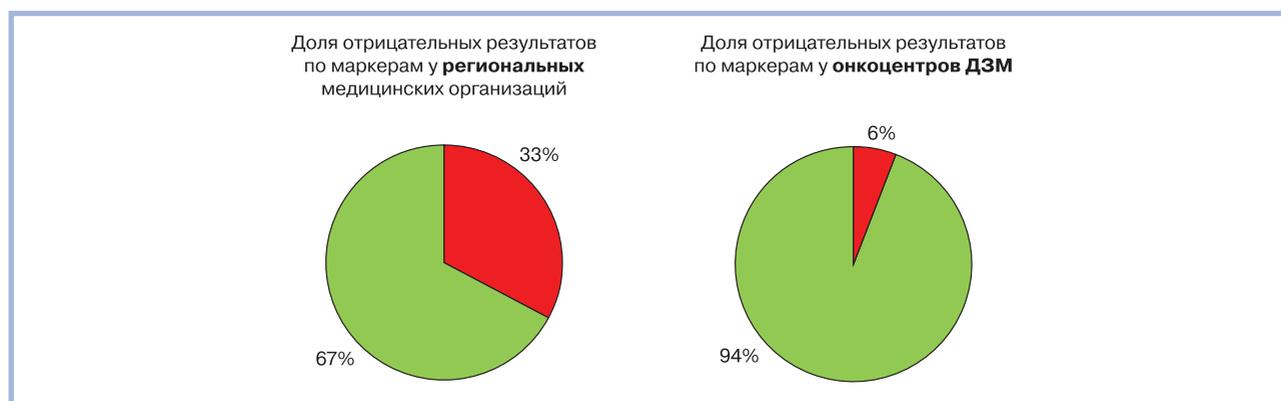


Рис. 2. Итоги раундов «Рак молочной железы» (маркеры ER, HER2, Ki-67) 2020—2021 гг.

Fig. 2. Results of rounds «Breast cancer» (markers ER, HER2, Ki-67) 2020-2021.

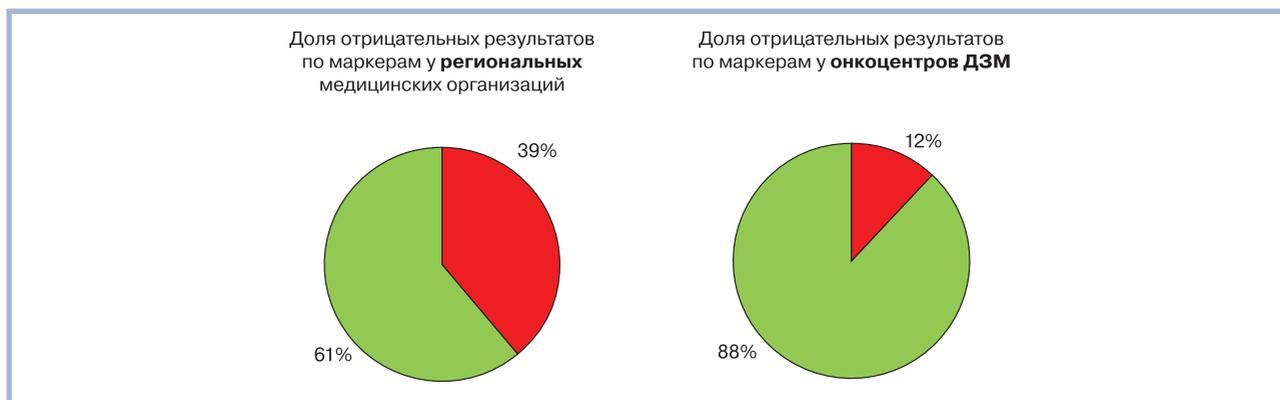


Рис. 3. Итоги раундов «Рак легкого» (маркеры ALK, TTF1, PD-L1) 2020—2021 гг.

Fig. 3. Results of rounds «Lung cancer» (markers ALK, TTF1, PD-L1) 2020—2021.

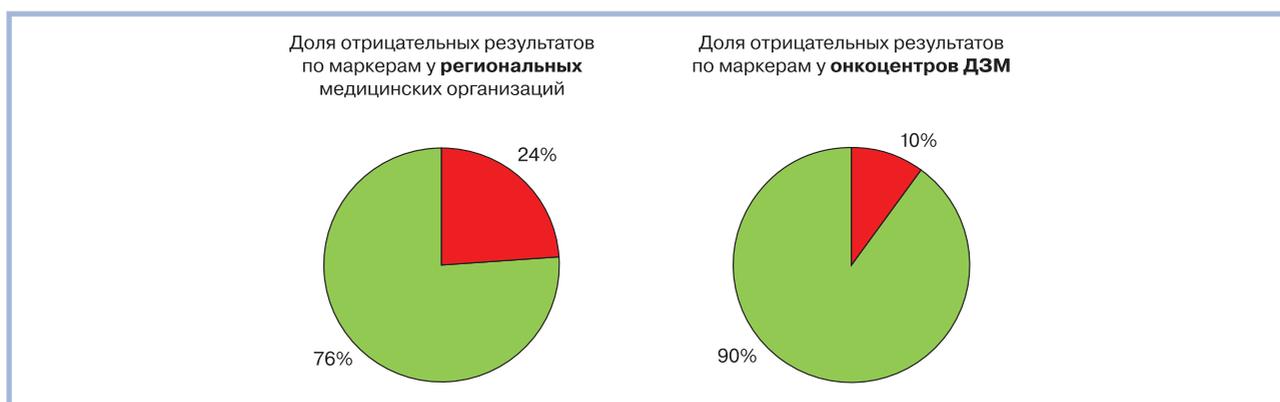


Рис. 4. Итог раунда «Лимфопролиферативные заболевания» (маркеры CD3, CD20, BCL2) 2021 г.

Fig. 4. Results of the round «Lymphoproliferative diseases» (markers CD3, CD20, BCL2) 2021.

ного рака (CD56, хромогранин А, р53). Результаты раундов показали увеличение доли отрицательных результатов в 2,5—3 раза (рис. 5).

Также в 2021 г. был впервые проведен регулярный раунд по интерпретации результатов ИГХ-исследования. Участникам были предложены для оценки сканированные изображения препаратов. Для этого раунда был выбран маркер PD-L1 SP142 и 3 локализации, в которых определяется его экспрессия для выбора терапии — рак легкого, рак мочевого пузыря и тройной негативный рак молочной железы. Этот раунд выявил наличие серьезных ошибок в интерпретации окрашивания и необходимость обучения и тренинга патологоанатомов при появлении в рутинной работе новых маркеров.

Проведенные по различным маркерам раунды высветили наличие типичных проблем в работе с обязательными маркерами как рака молочной железы, так и рака легкого, которые повседневно используются в клинической практике. Одной из причин отрицательных результатов может являться отсутствие или формально проведенная внутрилабораторная валидация протоколов окрашивания для использующихся клонов антител и систем визуализации. В целом при использовании открытых систем результаты были более вариабельными, чем при применении закрытых протоколов в стейнерах Ventana. Наилучшие результаты были получены лабораториями, выбравшими закрытые

наборы и протоколы для ИГХ-диагностики. Использование различных антител, систем детекции, инструментальных платформ обязательно требует проведения валидации метода в каждой лаборатории в соответствии с общепринятыми критериями (конкордантность лабораторного метода с валидированным должна составлять не менее 95%) на внутрилабораторных контролях и участия в программах внешнего контроля качества.

Важность получения корректного результата ИГХ-исследования для выбора адекватной терапии демонстрирует и анализ финансовых затрат в случае использования при назначении лечения непригодных для клинического использования данных, особенно учитывая возросшую нагрузку на бюджеты всех уровней в условиях пандемии COVID-19. Например, если в случае ложноположительного результата ИГХ-исследования будет принято ошибочное решение о назначении инновационной таргетной или иммунотерапии со стоимостью одного законченного случая от 202 тыс. до 468 тыс. руб. (Клинико-статистическая группа заболеваний дневного стационара уровень 12 и 13). Один пациент в среднем получает до 6 таких циклов терапии в течение 1 года. Это приведет к нерациональному использованию средств из бюджета системы ОМС в размере от 1,2 млн до 2,8 млн руб. [5]. Отсутствие эффекта от назначенной терапии, кроме прямых затрат, приводит к быстрому прогрессированию, инвалидизации и дальнейшим

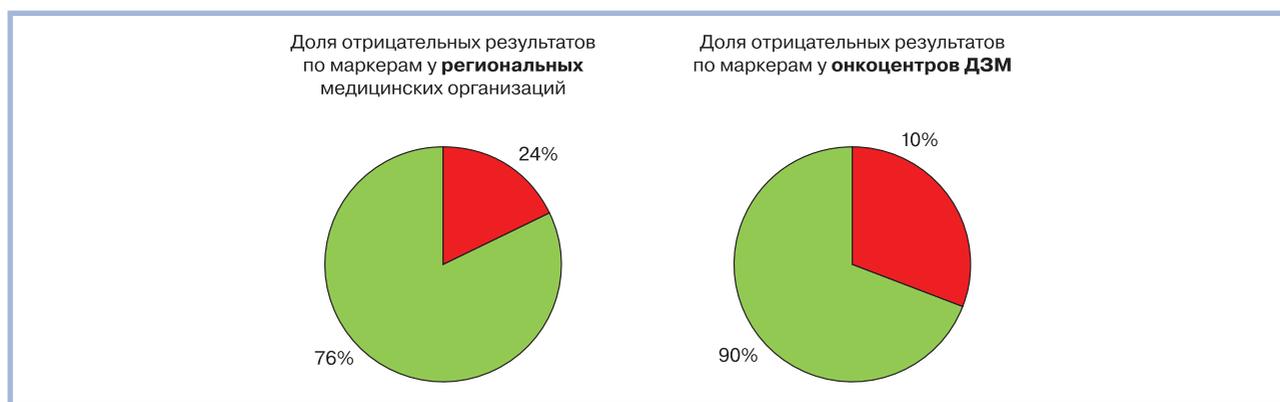


Рис. 5. Итоги раундов «Рак кишки» (маркеры panCK, CK20, CDX2) и «Нейроэндокринный рак» (маркеры CD56, p53, хромогранин А) 2020—2021 гг.

Fig. 5. Results of the rounds «Colon cancer» (markers panCK, CK20, CDX2) and «Neuroendocrine cancer» (markers CD56, p53, chromogranin A) 2020—2021.

затратам на последующую реабилитацию, а также дискредитирует использованные схемы лечения как в глазах пациентов, так и медицинского сообщества. Стоимость участия в раунде Центра контроля качества в 2022 г. составляет 58,5 тыс. руб., что в 34 раза меньше, чем потенциальные потери бюджета страны, выделяемого на нужды здравоохранения от необоснованного назначения лечения только одного пациента.

Центр контроля качества также вынужден констатировать, что, несмотря на информационные письма Минздрава России (№17-2/2809 от 19.04.18, №17-2/И/2-8454 от 19.07.19 и №17-2/И/2-16077 от 23.10.20), региональные онкологические диспансеры, а также государственные бюджетные медицинские организации, проводящие ИГХ-диагностику, проигнорировали участие в программе контроля качества по маркерам рака молочной железы более, чем в 50% случаев, а для маркеров рака легкого в 75%.

Регулярное прохождение контроля качества приведет к созданию системы подтверждения воспроизводимости оптимальных результатов медицинских учреждений, проводящих патолого-анатомические исследования биопсийного (операционного) материала с применением ИГХ-методов, позволит повысить уровень диагностики, улучшить качество оказания медицинской помощи онкологическим больным и снизить неэффективные траты бюджетных средств.

В итоге внедрение активного участия патолого-анатомических отделений в программу контроля качества ИГХ-исследований способствует повышению качества диагностики и создает основу для адекватной терапии пациентов со злокачественными опухолями.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Nielsen S. External quality assessment for immunohistochemistry: experiences from NordiQC. *Biotech Histochem.* 2015;90(5):331-340. <https://doi.org/10.3109/10520295.2015.1033462>
- Tripodi SA, Rocca BJ, Hako L, Barbagli L, Bartolommei S, Ambrosio MR. Quality control by tissue microarray in immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 2012;65(7):635-637. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200551>
- Завалишина Л.Э. Внешний контроль качества иммуногистохимических исследований в Российской Федерации. Отчет о проведении пилотных раундов. *Архив патологии.* 2018; 80(2):66-68. Zavalishina LE. External quality control of immunohistochemical studies in the Russian Federation. Report on pilot rounds. *Arkhiv Patologii.* 2018;80(2):66-8. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol201880266-68>
- Завалишина Л.Э., Шостак Е.А. Отчет о проведении раунда по контролю качества иммуногистохимических исследований. *Архив патологии.* 2019;81(4):83-84. Zavalishina LE, Shostak EA. Report on a round of the quality control of immunohistochemical studies. *Arkhiv Patologii.* 2019; 81(4):83-4. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20198104183>
- Постановление Правительства Москвы от 30 декабря 2020 г. №2401-ПП «О территориальной программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи в городе Москве на 2021 год и на плановый период 2022 и 2023 годов». Decree of the government of Moscow of December 30, 2020 N 2401-PP «About the territorial program of state guarantees of free provision of medical care to citizens in the city of Moscow for 2021 and for the planning period of 2022 and 2023». (In Russ.). <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/73652220/>

Поступила 16.11.2021

Received 16.11.2021

Принята в печать 22.12.2021

Accepted 22.12.2021

Карл Георгиевич Башарин. К 80-летию со дня рождения

Karl Georgievich Basharin. On the occasion of the 80th anniversary of his birth

Карл Георгиевич Башарин, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры нормальной и патологической анатомии, оперативной хирургии с топографической анатомией и судебной медицины медицинского института Северо-Восточного федерального университета (СВФУ) родился 2 июня 1942 г. в Якутске в семье служащих. В 1965 г. окончил медицинский факультет Якутского государственного университета и решением ученого совета факультета был принят в аспирантуру кафедры нормальной анатомии. В 1969 г. после успешной защиты степени кандидата медицинских наук Карл Георгиевич был принят ассистентом этой кафедры, где работает по настоящее время (с 1991 по 2019 г. он заведовал кафедрой).

Профессор Карл Георгиевич Башарин — автор более 360 печатных работ, в том числе 3 монографий, 15 учебных пособий, статей в журналах и сборниках. В 1977 г. К.Г. Башарин дал собственное оригинальное эвристическое определение патологической анатомии как науки и внедрил в технологию обучения студентов медицинского факультета и института СВФУ. В 1995 г. на I Международном съезде ассоциаций патологоанатомов это определение было одобрено и опубликовано в материалах. Таким образом Карл Георгиевич внес вклад в отечественную и мировую науку, сформировав базовое ключевое понятие, за что решением президиума Международной академии информатизации от 29 ноября 2002 г. ему присвоено высшее международное звание «Основоположник научного направления». В 2000 г. Карл Георгиевич Башарин первым из ученых Якутии стал лауреатом конкурса Международного форума в номинации за лучшую научную работу под девизом «Канун III тысячелетия — время итогов» за монографию «Патологическая анатомия туберкулеза легких на Крайнем Севере в современных условиях». Учитывая значимость данной работы, 2 октября 2001 г. он был избран действительным членом Международной академии наук экологии, безопасности человека и природы.

Карл Георгиевич Башарин является пионером изучения патоморфоза и патологической анатомии туберкулеза легких в Якутии — обширном регионе Арктической зоны Земли. Особенности патоморфоза и патологической анатомии легочного туберкулеза были представлены в докладах, сообщениях на международных, всесоюзных, всероссийских, региональных, республиканских конгрессах, съездах, конференциях, симпозиумах и получили высокую оценку специалистов как фундаментальный научный труд, представляющий основополагающее теоретическое и практическое значение для развития нового направления в науке северной фтизиатрии, что является достижением мирового уровня.

Профессор К.Г. Башарин внес весомую лепту в материально-техническую базу, учебную, методическую и научную работу кафедры. В 1993 г. он добился переезда кафедры из старого деревянного дома в каменное здание, что значительно улучшило материально-техническую базу кафедры. В настоящее время на кафедре работают 3 доктора ме-



дицинских наук, профессора, 5 кандидатов медицинских наук, доцента, 1 старший преподаватель. Функционируют научные студенческие кружки, открыта аспирантура. В 2015 г. за вклад в развитие отечественного образования и лекторское мастерство кафедра вошла в национальную программу «Золотой фонд отечественной науки» и награждена дипломом «Золотая кафедра России».

Профессор К.Г. Башарин как председатель Республиканского общества патологоанатомов Якутии активно участвует в организации и проведении аттестации врачей патологоанатомов, конференций, оказывает методическую помощь врачам патологоанатомам. За последние 20 лет членами общества опубликовано более 500 работ в центральных и местных изданиях. Благодаря самоотверженному труду всех поколений патологоанатомов патолого-анатомическая служба республики стала одной из лучших в Дальневосточном федеральном округе России.

В 1999 г. К.Г. Башарин организовал при кафедре постоянно действующий народный университет по формированию трезвого здорового образа жизни (ТЗОЖ). Университет подготовил более 15 тыс. слушателей, получивших знания, навыки и умения и способных выступать личным примером в формировании ТЗОЖ, а также осуществлять первичную профилактику пьянства, алкоголизма, табакокурения и наркомании. При кафедре он создал патолого-анатомический музей с макропрепаратами, взятыми при обследовании детей с аномалиями развития. В музее регулярно проводятся беседы, лекции по профилактике вредных привычек.

В 2003 г. К.Г. Башарин на Международной учредительной конференции по организации Международной академии трезвости в Севастополе стал одним из соучредителей

и был избран академиком и вице-президентом этой академии. Он создал школу собриологов Якутии (*от лат. sobrietas* — трезвость и греческого *logos* — учение, наука о путях достижения трезвости) из числа активных слушателей народного университета ТЗОЖ. В эту школу также вошли 5 академиков, 4 профессора и 4 доцента. Проф. К.Г. Башарин впервые за всю историю трезвеннического движения сформулировал закон трезвости — основной закон собриологии, опубликованный им в ряде учебных пособий и озвученный на международных конференциях собриологов в Севастополе, и что нарушение этого закона ведет к вырождению и гибели всего человечества. Проф. К.Г. Башарин разработал и внедрил в практику эффективный метод первичной профилактики пьянства, алкоголизма, табакокурения, наркомании — мастер-класс «Угловские чтения», которые проводятся ежегодно всем первокурсникам СВФУ с 2009 г. В 2015 г. этот проект выиграл грант — субсидию Правительства Республики Саха (Якутия) для проведения «Угловских чтений» в городах Якутске, Мирном, Покровске, в Булунском, Хангаласском, Намском, Чурапчинском районах, а также городах Санкт-Петербурге и Сочи. В результате систематической активной информационно-разъяснительной работы соратников — слушателей народного университета ТЗОЖ в школах, вузах, среди населения о вреде даже малых доз алкоголя табака и наркотиков при поддержке главы Правительства Республики Саха (Якутия) и депутатского корпуса за последние 5 лет 188 поселений Якутии отказались от розничной торговли алкогольных напитков и стали территориями трезвости.

Профессор К.Г. Башарин проводит большую работу по формированию патриотизма и духовно-нравственной личности у студентов университета и учащейся молодежи городов и районов республики.

Профессор К.Г. Башарин педагогическую, научную работу сочетает с общественной, просветительской деятельностью. Будучи активным лектором российского общества «Знание», он прочитал более 15 тысяч лекций в городах и районах Якутии, а также во многих городах России по профилактике пьянства, алкоголизма, табакокурения, наркомании, о секретах активного долголетия, профилактики туберкулеза легких, сердечно-сосудистых и онкологических болезней и т.д. К.Г. Башарин пропагандирует мир, дружбу, сотрудничество народов, читая стихи поэтов России, Якутии и других народов в смотрах художественной самодельности университетского, городского, республиканского и всероссийского уровня. Просветительская деятельность Карла Георгиевича Башарина высоко оценена общественными организациями Республики Саха (Якутия) и России. Он награжден государственной наградой РФ, орденом «За заслуги перед Отечеством» 2 степени, медалями С.И. Вавилова, «За верность России» и премиями Н.И. Пирогова, Петровской академии наук и искусств, ему присвоены почетные звания выдающегося деятеля Всемирного трезвеннического движения, заслуженного деятеля науки Республики Саха (Якутия). В 2019 г. он стал лауреатом общественной премии «Якутянин года — 2019». Карл Георгиевич Башарин — почетный гражданин Чурапчинского и Намского улусов Республики Саха (Якутия), почетный работник высшего профессионального образования Российской Федерации, почетный ветеран СВФУ.

Коллектив кафедры сердечно поздравляет дорогого учителя, наставника Карла Георгиевича с 80-летним юбилеем. Желаем крепкого здоровья, неиссякаемой жизненной энергии, бодрости духа, долгих лет плодотворной деятельности, благополучия Вам и Вашим близким!

Д.К. Гармаева, проф., зав. кафедрой нормальной и патологической анатомии, оперативной хирургии с топографической анатомией и судебной медицины медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова

Памяти Александра Евдокимовича Доросевича

In memory of Aleksandr Evdokimovich Dorosevich

10 февраля 2022 г. на 76-м году ушел из жизни Александр Евдокимович Доросевич, доктор медицинских наук, профессор, отличник здравоохранения, заслуженный деятель науки Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Александр Евдокимович Доросевич — талантливый руководитель, высококвалифицированный специалист в области здравоохранения, известный ученый, член правления Международного союза ассоциаций патологоанатомов президиума Российского общества патологоанатомов, член Центральной учебно-методической проблемной комиссии при Минздраве России по преподаванию патологической анатомии, член Европейского общества патологов, академик Международной академии патологии.

После окончания с отличием в 1971 г. лечебного факультета Смоленского государственного медицинского института Александр Евдокимович прошел путь от аспиранта до заведующего кафедрой патологической анатомии.

Александр Евдокимович был талантливым и эрудированным педагогом. Он воспитал целую плеяду врачей и ученых-патологов, работающих сегодня в России, ближнем и дальнем зарубежье.

Александр Евдокимович разработал и внедрил в педагогический процесс основные принципы интеграции патологической анатомии с медико-биологическими дисциплинами. Это был человек искренне преданный своей профессии, продвигавший в жизнь передовые идеи организации патолого-анатомической службы в России. Созданный и руководимый им на протяжении 27 лет первый и единственный в России Смоленский областной институт патологии доказал эффективность этой формы организации патолого-анатомической службы, которая гармонично объединила образование, науку, практику и успешно решала задачи научно-исследовательского и организационно-практического (патолого-анатомического) характера.

Свою педагогическую и широкомасштабную общественную деятельность А.Е. Доросевич активно сочетал с научной работой. Науку он почитал как свое главное предназначение. Защитив в 1989 г. докторскую диссертацию на тему «Паренхиматозно-стромальные взаимоотношения при раке молочной железы до и после лучевой терапии (гистологическое и иммуноморфологическое исследование)», он развивал свою научную школу и опубликовал, будучи автором и соавтором, 293 научные работы, целый ряд руководств и монографий, предложил и внедрил в практику более 6 изобретений и получил на них 3 патента.

Как автор научных трудов Александр Евдокимович обосновал ключевые иммуноморфогенетические этапы инфекционно-аллергического миокардита, особенности паренхиматозно-стромальных взаимоотношений рака молочной железы как основополагающего материального



звена не только морфогенеза, но и оценки лучевой терапии и индивидуального прогноза больных раком молочной железы, морфологический эквивалент блокады иммунного взаимодействия лимфоцитов и опухолевых клеток, указал на существование иммунокомплексно-негативных и позитивных опухолей. А.Е. Доросевич является автором гипотезы о соматической гибридизации клеток при раке как одного из механизмов, объясняющего несостоятельность иммунологического надзора.

А.Е. Доросевичем были обоснованы следующие концепции:

- о ведущей роли коммуникационных систем, которые представлены не только вегетативными нервными терминалями и сосудами микроциркуляторного русла, но и их посредственным клеточным микроокружением при дистрофических, воспалительных и опухолевых процессах;

- о биполярности (интеграции и дезинтеграции) стромального компонента, ведущего к прогрессии заболевания.

При научной консультации и под руководством Александра Евдокимовича подготовлено 13 докторов и 32 кандидата наук.

За большой вклад и заслуги в области здравоохранения, научной и педагогической деятельности Александр Евдокимович Доросевич отмечен:

- нагрудным значком «Отличнику здравоохранения» (2003 г.);

- Почетной грамотой Министерства здравоохранения России (2017 г.);

- Благодарностью Министерства общего и профессионального образования Российской Федерации (1996 г.);

— Почетной грамотой Администрации Смоленской области (2006 г.);

— Почетной грамотой Смоленской областной думы (2008 г.);

— Благодарственным письмом губернатора Смоленской области (2010 г.);

— Благодарностью Президента Российской Федерации за достигнутые трудовые успехи, значительный вклад в социально-экономическое развитие Российской Федерации, заслуги в гуманитарной сфере, многолетнюю добросовестную работу и активную общественную деятельность (2014 г.);

— Почетной грамотой президиума Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации (2016 г.).

И совсем недавно доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии СГМУ, Александр Евдокимович Доросевич, Указом Пре-

зидента Российской Федерации от 18 мая 2021 г. удостоен почетного звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

До последней минуты своей жизни Александр Евдокимович активно планировал работу по активизации научно-исследовательской и инновационной деятельности с привлечением опыта ведущих университетов в области развития стратегического лидерства в рамках программы «Приоритет-2030».

Светлая память об Александре Евдокимовиче Доросевиче навсегда останется в сердцах его родных, коллег, друзей и учеников на долгие годы.

Коллектив Смоленского государственного медицинского университета, кафедры патологической анатомии, студенты, ординаторы глубоко скорбят по поводу смерти Александра Евдокимовича Доросевича и выражают искренние соболезнования его родным и близким.

Новое слово в транспортировке и хранении образцов



MILESTONE
HELPING
PATIENTS

Seal Tissue **SAFE**



Сохранение материала
для ИГХ и молекулярных
исследований



Фиксация материала
начинается
в контролируемых
условиях лаборатории



Герметичный пакет
для документов
обеспечивает
безопасность информации

- Профессиональная защита от токсичных паров формалина, а также бактерий и вирусов
- Нет риска пролития при транспортировке и хранении
- Экономия места для хранения – пакеты укладываются в стопки
- Снижение затрат на утилизацию благодаря уменьшению объема биологически опасных материалов с помощью вакуумных пакетов



Система вакуумной упаковки биологических образцов с добавлением фиксатора СилСЕЙФ (Seal SAFE), с принадлежностями — РУ № РЗН 2022/16648
Аппарат для упаковки биологических образцов ТИШЬЮ СЕЙФ (TISSUE SAFE) — РУ № РЗН 2013/1130
Пакеты для аппаратов ТИШЬЮ СЕЙФ (TISSUE SAFE) и СилСЕЙФ (Seal SAFE) для упаковки под вакуумом биологических образцов — РУ № РЗН 2019/8538

Компания «БиоЛайн» — официальный дистрибьютор Milestone (Италия)



ООО «БиоЛайн»
Россия, 197022, Санкт-Петербург
ул. Профессора Попова, д. 23, лит. Е
тел.: +7 (812) 320 49 49
e-mail: main@bioline.ru

Россия, 127055, Москва,
Бутырский вал, 68/70,
стр. 1, 3 этаж, офис 34
тел.: +7 (800) 555 49 40
www.bioline.ru

Единый бесплатный
номер сервисной
службы для всех
регионов России:
8 800 444 33 49