

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 616–006.04+616–018

doi:10.18499/2225-7357-2025-14-4-21-33

3.3.2 – патологическая анатомия



Гистологическая и иммуногистохимическая оценка тканей иммунодефицитных мышей с ксенографтами опухоли после введения НК-клеток человека

Е. В. Абакушина¹, И. А. Степанова^{1✉}, С. А. Румянцев²¹ООО «Текон МП», Москва, Россия²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова, Москва, Россия

Аннотация. Иммуноонкология – активно развивающаяся область научно-прикладных исследований, которая произвела революцию в лечении рака. В частности, НК-клетки классифицируются как цитотоксические лимфоциты, которые играют решающую роль в распознавании и устранении злокачественных или инфицированных клеток. **Цель исследования** – проведение гистологической и иммуногистохимической оценки ксенографтов опухоли человека (рака поджелудочной железы человека) и внутренних органов иммунодефицитных мышей после введения суспензии НК-клеток человека. **Материал и методы.** Предварительно на 4 мышах линии NBSGW были смоделированы ксенографты путем подкожного введения клеток опухолевой линии ASPC-1 (рак поджелудочной железы человека). На 24-е сутки исследования животным вводили суспензию НК-клеток мышам №2 и №4 внутривенно в количестве 8,8 млн и 9,2 млн, и подкожно – мышам №1 и №3 в количестве 10 млн и 14 млн НК-клеток, соответственно. На 28-е сутки исследований проводили эвтаназию животных и патоморфологическое исследование. Проводили рутинную гистологическую оценку внутренних органов мышей, иммуногистохимию образцов ксенографтов на наличие опухолевых клеток с антителами Cytokeratin 7 и Pan-Cytokeratin, а также ксенографтов и внутренних органов мышей на наличие CD56⁺ клеток. **Результаты.** Гистоархитектоника органов и тканей у животных была сохранена, в легких были обнаружены метастазы, инфильтрации CD56⁺ клеток в этой зоне в ткани легкого отмечено не было. В ксенографтах наблюдались единичные слабо-позитивные CD56⁺ клетки, окрашивание мембраны которых было на грани видимости. В селезенке CD56⁺ клетки были единичные, также ярко окрашивалась часть сосудов ксенографта и селезенки (периферические нервные волокна, перипиты). В образцах ксенографтов визуализировалась мелкокапельная дистрофия онкоцитов, воспалительная инфильтрация и индекс клеточного обновления был меньше или равен 1,0, что в комплексе свидетельствовало о слабо выраженных изменениях структуры опухоли. **Заключение.** Терапевтическое воздействие суспензии НК-клеток повышает опухолевый патоморфоз и ведет к увеличению области некрозов, в то время как индекс коэффициента клеточного обновления снижается. Необходимы дальнейшие исследования с увеличением дозы или кратности введения.

Ключевые слова: иммуногистохимия; гистология; НК-клетки; ксенографт опухоли; иммунодефицитные мыши

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Абакушина Е.В., Степанова И.А., Румянцев С.А. Гистологическая и иммуногистохимическая оценка тканей иммунодефицитных мышей с ксенографтами опухоли после введения НК-клеток человека // Журнал анатомии и гистопатологии. 2025. Т. 14, №4. С. 21–33. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-4-21-33>

ORIGINAL ARTICLES

Original article

Histological and immunohistochemical evaluation of tissues from immunodeficient mice with of tumor xenografts following administration of human NK cells

E. V. Abakushina¹, I. A. Stepanova^{1✉}, S. A. Roumiantsev²¹Tekon MP LLC, Moscow, Russia²I.I. Dedov National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russia

Abstract. Immuno-oncology is an actively developing area of applied research that has revolutionized cancer treatment. In particular, NK cells are classified as cytotoxic lymphocytes that play a crucial role in recognizing and eliminating malignant or infected cells. **The aim** of the study was to perform a histological and immunohistochemical evaluation of human tumor xenografts (human pancreatic cancer) and internal organs of

immunodeficient mice following the administration of a human NK cell suspension. **Material and methods.** Previously, xenografts were modeled on 4 NBSGW mice by subcutaneous administration of ASPC-1 tumor cells (human pancreatic cancer). On day 24 of the study, the animals were injected with NK cell suspension intravenously in the amount of 8.8 million and 9.2 million to mice №2 and №4, and subcutaneously in the amount of 10 million and 14 million NK cells to mice №1 and №3, respectively. On day 28 of the study, the animals were euthanized and pathomorphologically examined. Routine histological assessment of the internal organs of the mice, immunohistochemistry of xenograft samples for the presence of tumor cells with Cytokeratin 7 and Pan-Cytokeratin antibodies, as well as xenografts and internal organs of mice for the presence of CD56⁺ cells were performed. **Results.** The histoarchitecture of organs and tissues in animals was preserved, metastases were found in the lungs, no infiltration of CD56⁺ cells in this area of the lung tissue was noted. Single weakly positive CD56⁺ cells were observed in the xenografts, the membrane staining of which was barely visible. In the spleen, CD56⁺ cells were single, and part of the xenograft and spleen vessels (peripheral nerve fibers, pericytes) were also brightly stained. In the xenograft samples, small-droplet dystrophy of oncocytes, inflammatory infiltration and the cell renewal index were visualized less than or equal to 1.0, which together indicates mild changes in the tumor structure. **Conclusion.** The therapeutic effect of the NK cell suspension increases tumor pathomorphism, the areas of necrosis increase, while the cell renewal coefficient index decreases, but further studies are needed with an increase in the dose or frequency of administration.

Keywords: immunohistochemistry; histology; NK cells; tumor xenograft; immunodeficient mice

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Abakushina E.V., Stepanova I.A., Roumiantsev S.A. Histological and immunohistochemical evaluation of tissues from immunodeficient mice with of tumor xenografts following administration of human NK cells. *Journal of Anatomy and Histopathology. 2025. V. 14, №4. P. 21–33.* <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-4-21-33>

Введение

Иммуноонкология – активно развивающаяся область научно-прикладных исследований, которая произвела революцию в лечении рака. Особенно успешно применяются терапевтические подходы на основе дендритных клеток, Т-клеток, модифицированных Т-клеток (CAR-T) при лечении гематологических злокачественных новообразований [11, 17, 22]. Стоит отметить, что большинство иммуномодулирующих стратегий базируются на усилении Т-клеточных ответов, но в последнее время активно изучается компартмент естественных клеток-киллеров (NK) для терапевтических вмешательств [12, 23]. Существует большое количество вариантов NK-клеток, а также их активность может меняться в пределах разных органов и тканей из-за их динамической природы.

Естественные (натуральные) киллеры (NK) – клетки врожденного иммунитета, на долю которых приходится 5–10% лимфоцитов периферической крови [22]. NK-клетки классифицируются как цитотоксические лимфоциты, которые играют решающую роль в распознавании и устранении злокачественных или инфицированных клеток. Одним из механизмов активации NK-клеток является отсутствие на их поверхности молекул основного комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I). Экспрессия МНС-I в клетках часто подавляется неопластической трансформацией и вирусной инфекцией, что делает эти клетки мишенями для NK-клеток, в то время как для связывания с CD8⁺ Т-клетками, наоборот, требуется презентация антигена молекулами МНС-I [1, 12, 22]. Контактный цитоллиз реализуется или при непосредственном контакте с рецепторами «смерти» на поверхности клеток-мишеней, или путем выброса цитотоксических гранул, содержащих перфорин, гранзимы, сериновые протеиназы. Также

NK-клетки способны секретировать различные цитокины и хемокины, чем оказывают активное влияние на многие звенья врожденного иммунитета (макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и др.) Зрелые NK-клетки экспрессируют различные рецепторы, которые модулируют их активность в отношении клеток-мишеней [1, 10, 12]. Эти уникальные характеристики делают NK-клетки привлекательным вариантом для адоптивной иммунно-клеточной терапии [5, 22]. Аллогенный перенос NK-клеток, полученных от здоровых доноров, или использование химерных антигенных рецепторов (CAR)-NK-клеток показали многообещающие результаты при лечении различных типов рака. Однако у этого метода также есть ряд ограничений в применении. Одним из основных ограничений эффективности адоптивной терапии NK-клетками является низкая способность перенесенных NK-клеток проникать в опухоли, и сейчас активно разрабатываются способы повысить инфильтративную способность NK-клеток [5, 24].

Это особенно актуально в контексте солидных опухолей, поскольку известно, что NK-клетки, праймированные IL-2, подвергаются активационно-индуцированной клеточной гибели (AICD) после взаимодействия с эндотелиальными клетками с возможным негативным воздействием на экстравазацию и инфильтрацию опухоли. В то же время солидные опухоли, в отличие от гематологических злокачественных новообразований, имеют сложное иммунное микроокружение, которое влияет на инфильтрацию NK-клеток и впоследствии обуславливает ограниченную эффективность против солидных опухолей [5, 19, 22, 26]. Ксенотрансплантация линий клеток человека мышам является одной из наиболее простых, эффективных и часто используемых модельных систем для изучения иммунотерапии рака [20]. Мыши с ослабленным иммунитетом являются оптимальными реципиентами

для воспроизведения опухолей человека, но их отличная от человеческой иммунная система приводит к определенным трудностям в трансляции получаемых результатов. Действительно, на течение рака существенно влияет взаимодействие с организмом хозяина, в том числе его иммунной системой. Следовательно, отсутствие иммунной системы человека в этих мышинных моделях дает значительные ограничения. По этой причине наблюдается растущий интерес к «гуманизированным мышинным моделям»: мышам с ослабленным иммунитетом, которым трансплантируют предшественники гемопоэза и/или лимфоидные ткани, способные воспроизводить у мышей несколько типов иммунных клеток человека.

Для изучения биологии рака доступно несколько доклинических моделей *in vitro* и *in vivo*, в том числе клеточные линии и производные от них ксенотрансплантаты, генно-инженерные мышинные модели, органоиды и модели ксенографтов опухолей, полученных от пациента (PDX). Авторами было установлено, что гистологический анализ ксенотрансплантатных опухолей аденокарциномы поджелудочной железы от пациента показал, что степень дифференцировки опухоли человека сохранялась в каждом из соответствующих ксенотрансплантатов, при этом характерной чертой стромы опухолей аденокарциномы поджелудочной железы являлись фибробласты и большое количество коллагена, который состоял из организованных и неорганизованных волокон, аналогичным образом встречающихся в злокачественном эпителии соответствующей опухоли пациента [14, 21], что согласовывается с результатами нашего исследования. Другими авторами была создана ортотопическая и ксенотрансплантатные модели опухоли поджелудочной железы человека LM-P (субклоны с чистой морфологией эпителия) на иммунодефицитных мышах. Окрасивание гематоксилином и эозином аденокарциномы в результате показало признаки высокодифференцированных ядер, участки некроза и кровоизлияния, участки десмоплазии. Для иммуногистохимической верификации использовали цитокератин 19, который хорошо экспрессировался в опухолях. Железистые участки показывали более последовательное цитоплазматическое окрашивание, чем низкодифференцированные участки опухоли [25].

Цель исследования – проведение гистологической и иммуногистохимической оценки ксенографтов опухоли (рака поджелудочной железы человека) и внутренних органов иммунодефицитных мышей после введения суспензии NK-клеток человека.

Материалы и методы исследования

Место и время проведения исследования. Исследование было проведено на

базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России в период с апреля по сентябрь 2023 года.

Характеристика объекта исследования. Для моделирования ксенографтов опухоли человека были подготовлены 4 особи клинически здоровых иммунодефицитных мышей линии NBSGW с SPF-статусом, 2 самца и 2 самки, в возрасте 8–12 недель.

Способ формирования выборки – случайный. Животным применяли индивидуальную идентификацию методом маркировки хвостов краской.

Дизайн исследования. В 0-й день исследования всем животным в область правого бедра была проведена подкожная инъекция клеток опухолевой линии ASPC-1 (рак поджелудочной железы человека) в растворе PBS в дозе 4 млн в объеме 200 мкл на особь. При проведении предварительной проточной цитофлуометрии было установлено, что жизнеспособность клеток составила 86–94%. В течение 24 суток проводили ежедневное наблюдение за животными и периодические клинические осмотры, включая измерение размеров опухоли. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках модели GM500 («Tecniplast», Италия), с воздушными НЕРА фильтрами. На 24-е сутки исследования животным вводили суспензию NK-клеток: мышам №2 и №4 – внутривенно в количестве 8,8 млн и 9,2 млн NK-клеток, мышам №1 и №3 – подкожно в количестве 10 млн и 14 млн NK-клеток, соответственно. На 28-е сутки исследований проводили эвтаназию животных с помощью передозировки газового наркоза с последующей цервикальной дислокацией.

Методы. Аутопсия. Проводили вскрытия животных №1, №2 и №4 с последующим макро- и микроскопическим исследованием тканей органов стандартным методом аутопсии. При макроскопическом исследовании было отмечено, что покровы животных были бледно-серого цвета, макроскопически опухолевые узлы визуализировались в проекции бедра, при этом кожа на всем протяжении не была вовлечена в процесс и не спаивалась с подлежащей опухолевой тканью, в зоне опухолевых узлов цвет не был изменен. Отмечалось, что мягкие ткани бедра на разрезе были без особенностей, опухоль не прорастала в мышцы и кости, а также не было прорастания в органы брюшной полости. При вскрытии брюшной и грудной полостей все органы были обычного гистологического строения, расположение органов правильное, листики брюшины и диафрагма куполообразной формы были не утолщены. В брюшной полости жидкости не было обнаружено, печень эластичная, коричневого цвета, за края реберной дуги не выступала, селезенка была скрыта среди петель кишечника, красного цвета,

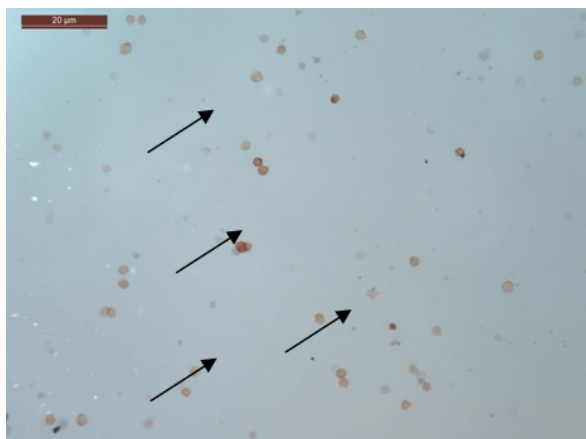


Рис. 1. Контрольный образец на антитело CD56. Препарат-мазок культуры НК-клеток. Клетки с разной интенсивностью позитивного окрашивания от слабо до ярко окрашенных. Положительный контроль (коричневое окрашивание). Иммуноцитохимическое исследование с антителом к CD56, $\times 400$.

Fig. 1. Control sample for CD56 antibody. NK cell culture smear. Cells with varying positive staining intensity, from weakly to brightly stained. Positive control (brown staining). Immunocytochemistry with CD56 antibody, $\times 400$.

мягко-эластичной консистенции. Наблюдалось, что большой сальник был с умеренным количеством желтой жировой ткани, без кровоизлияний, кишечник был неравномерно вздут, серо-розового цвета, желудок мешковидной формы, серо-розового цвета, без особенностей. Почки были обычного строения, капсула легко отходила, желтовато-коричневого цвета; надпочечники желторозового цвета, без особенностей. Легкие полностью выполняли плевральные полости, красноватого цвета, обычной воздушности, с мелкоочечными кровоизлияниями, мягковатой консистенции, трахея обычного строения. Сердце было обычной формы, эластичной консистенции, аорта не утолщена. Отмечалось, что макроскопические опухолевые узлы и метастазы не определялись.

Гистологическое исследование. Образцы тканей фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином (HistoSafe®, Россия) в течение 48 часов при комнатной температуре, обезвоживали в спиртах, пропитывали парафином и изготавливали парафиновые блоки по стандартизованному протоколу проводки, основываясь на рекомендациях производителя реактивов, в автоматическом гистологическом процессоре VIP 5 Jr (Sakura, Япония) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США) изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, которые монтировали на предметные стекла и высушивали в термостате при температуре 37°C в течение 2 часов. Окрашивание гистологических препаратов проводили гематокси-

лином и эозином в соответствии с рекомендациями производителя (ЭргоПродакшн, Россия). Перед выполнением специфического окрашивания гистологические препараты депарафинировали в двух сменах ксилола по 5 минут и дегидратировали в 3 сменах изопропилового спирта по 5 минут. После депарафинизации и регидратации срезы помещали в дистиллированную воду на 5 минут.

Иммуногистохимическое исследование. Для иммуногистохимической верификации клеток использовали следующие первичные антитела: к Cytokeratin 7 / CK7 (IR619, clone OV-TL, RTU, Dako Agilent, Сингапур); к CD56⁺ (AM0211, clone 123C3, Xiamen Talent Biomedical Technology, Китай); к Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) (Dako Agilent, Сингапур). ИГХ реакции проводили, основываясь на рекомендациях фирмы-производителя первичных антител. В ходе работы был подобран оптимальный протокол окраски: срезы толщиной 3 мкм монтировали на стекла с поли-L-лизиновым покрытием (Yancheng Huida Medical Instr, Китай), высушивали в термостате в течение 18 часов при 37°C, депарафинировали, дегидратировали и производили демаскировку антигенов в буфере pH 9,0 в модуле PT-Link (Dako, Дания) при 97°C в течение 20 минут. Блокировку эндогенной пероксидазы проводили с использованием 3% перекиси водорода (Самарская фармацевтическая фабрика, Россия), время экспозиции – 10 минут при комнатной температуре во влажной камере. Инкубацию срезов с первичными антителами проводили 30 минут при температуре 37°C во влажной камере. Для визуализации продукта реакции с антителами использовали универсальную двухстадийную систему детекции PrimeVision с хромогеном DAB (ПраймБиомед, Россия). Проводили общепринятые отрицательные и положительные контрольные процедуры при обработке параллельных срезов. Отрицательный контроль проводился с заменой первичных антител на TBS-буфер. В качестве положительного контроля антител CD56⁺ использовали культуру НК-клеток, которую использовали для введения животным (рис. 1). Для иммуноцитохимического окрашивания изготавливали мазки на стеклах с поли-L-лизиновым покрытием (Yancheng Huida Medical Instr, Китай), высушивали при комнатной температуре 24 часа, фиксировали 96° этанолом и окрашивали в одной партии вместе с гистологическими препаратами по той же методике.

Для антител Cytokeratin 7 и Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) были определены внутренние положительные контроли в ткани легкого. За позитивные клетки принимали клетки, имеющие специфическое мембранное коричневое (DAB⁺) окрашивание при микроскопии. Для мыши №2 проводили исследование ткани легкого, при этом отмечались внутренние положительные контроли на антитела:

СК7 – эпителий бронха со специфическим окрашиванием, CD56 – нервные пучки и нервные окончания на мембранах клеток.

Микроскопия. Использовали микроскоп Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Corporation, Tokyo, Япония) с объективами 4×, 10×, 20× и 40×, и окулярами 10×, оснащенного цветной камерой высокого разрешения DS-Fi2, и программой NIS-Elements BR, v. 4.3 (Nikon Corporation, Tokyo, Япония).

Морфологическое исследование. Для анализа гистологических изменений в исследуемых органах (в селезенке, лимфатических узлах, ксенографтах) были выбраны параметры, отражающие отклонения от гистологической нормы: дистрофические изменения в клетках паренхимы и стромы, нарушения кровообращения, воспаление, а также была проведена оценка степени васкуляризации ксенографта (в баллах от 0 до 3). В качестве критериев оценки структурных изменений в ксенографтах использовались следующие показатели: воспалительная инфильтрация отдельно в толще опухоли и по границе, наличие гигантских клеток опухоли, наличие пенных макрофагов, мелкокапельная дистрофия онкоцитов, некроз, нарушение кровообращения (полнокровие, кровоизлияния, сладжи эритроцитов, лейкостаз), фиброз, васкуляризация ксенографта. Кроме того, определяли митотический индекс (МИ) – доля делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток (×400).

МИ = число фигур митозов/количество опухолевых клеток в поле зрения × 100%.

Апоптотический индекс (АИ) рассчитывали как количество гибнущих клеток с признаками апоптоза и апоптотических телец от общего числа проанализированных клеток (×400).

АИ = число гибнущих клеток с признаками апоптоза и апоптотических телец/количество опухолевых клеток в поле зрения × 100%.

Коэффициент клеточного обновления опухоли: ККО = МИ/АИ.

Статистический анализ не проводился. Для проведения статистической обработки недостаточно количества образцов на группу.

Этическая экспертиза. В ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России существует «Политика работы с лабораторными животными», разработанная на основе действующих в Европейском Союзе принципов, изложенных в «Директиве по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Directive for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (2010/63/EU)) и «Постановлении о размещении и уходе за лабораторными животными» (Resolution on the accommodation and care of laboratory animals, 1997). Протокол исследования не подлежал

рассмотрению на IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee – этический комитет по уходу за животными), так как исследование носило пилотный характер, количество используемых в нем животных не превышало 5 голов, а манипуляции, проводимые с ними, классифицировались как малоинвазивные.

Результаты и их обсуждение

В результате опыта было установлено, что гистоархитектоника органов и тканей у животных №1, №2, №4 была сохранена, индивидуальные особенности (кровенаполнение, воспалительная инфильтрация) были слабовыраженными и укладывались в обычную гистологическую картину (рис. 2).

Отмечено, что в образцах ткани легкого у данных животных были обнаружены мелкие метастазы в разных отделах легкого, размерами от 100 до 450 мкм, макроскопически не визуализировались (рис. 3).

Метастазы преимущественно располагались субплеврально и перибронхиально, а опухолевая ткань с патологическими митозами была практически не васкуляризована. При анализе ксенографтов животных установлено, что они были солидного типа роста, преимущественно представлены крупными клетками с эозинофильной умеренно-выраженной цитоплазмой, увеличенными округлыми, овальными, вытянутыми ядрами с заметными 1–3 ядрышками. При этом строма была сильно развита, а опухоль умеренно инфильтрирована лимфоцитами и лейкоцитами, в окружающей дерме визуализировалась умеренная лимфоидная инфильтрация. На отдельных участках опухоль была отграничена от эпидермиса тонкой соединительнотканной капсулой, которая также была инфильтрирована лимфоцитами и лейкоцитами. Опухолевая ткань была хорошо васкуляризована, присутствовало выраженное микроциркуляторное русло, сосуды были неравномерно расширены с выраженным полнокровием, стазами, кровоизлияниями и лейкодиapedезом. Органы мыши №3, павшей до выведения из опыта, были доставлены в гистологических кассетах в формалине. Визуально фрагменты были без значимых особенностей, местами отмечались мелкоочечные кровоизлияния. При морфологическом описании органов мыши №3 обнаружены следующие гистологические особенности: лимфо- и лейкоцитарная диффузная инфильтрация в толще ткани легкого, лейкостаз в сосудах, в селезенке отмечалась лимфо- и лейкоцитарная диффузная инфильтрация; метастазы не обнаружены (рис. 4).

В результате проведения аутопсии мышей №1, №2 и №4 было отмечено, что в области ксенографтов кожа на всем протяжении в опухолевой процесс не вовлечена, не спаяна с подлежащей опухолевой тканью, в зоне

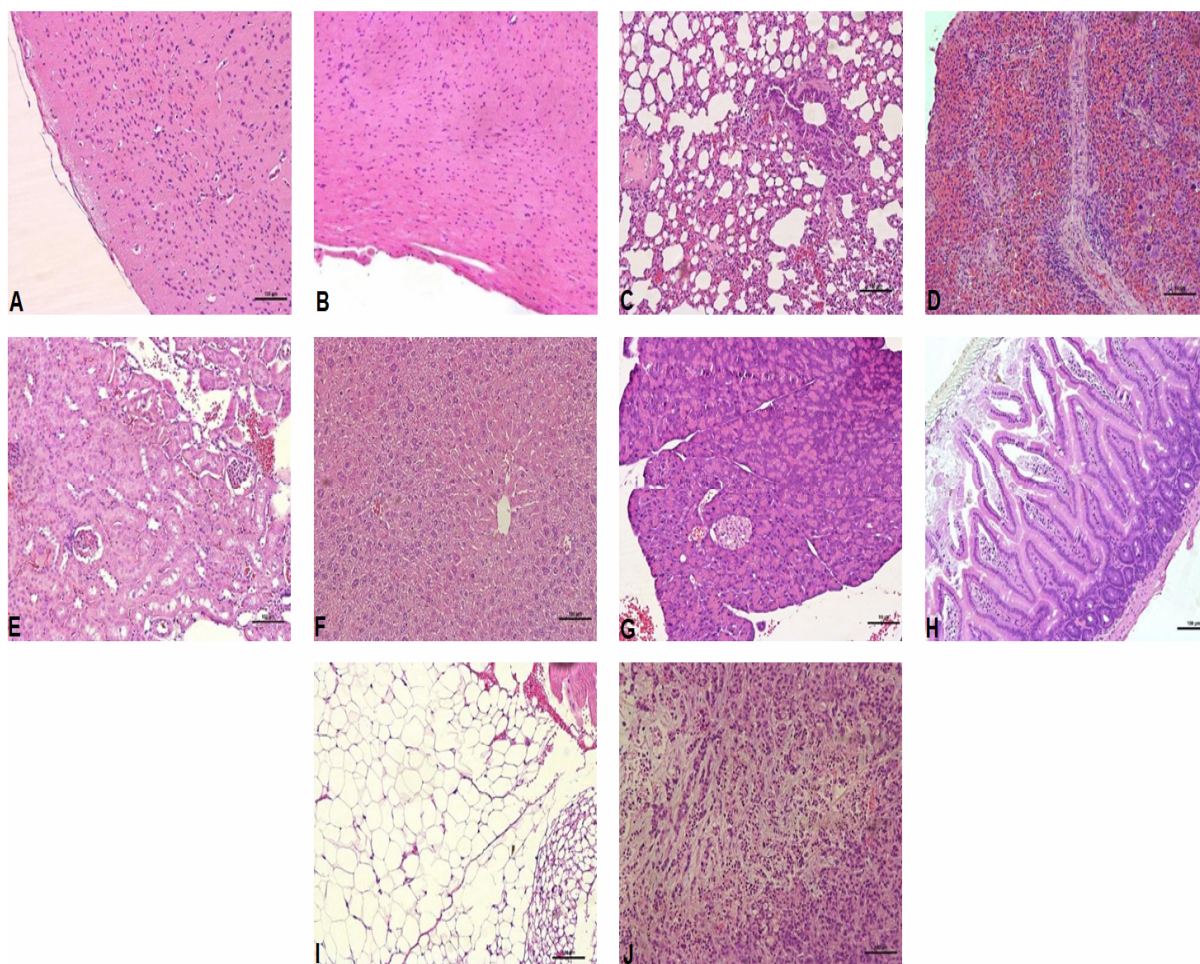


Рис. 2. Репрезентативные фотографии гистологического строения органов мыши №2. А – головной мозг, В – сердце, С – легкое, D – селезенка, E – почка, F – печень, G – поджелудочная железа, H – кишка; I – брыжейка; J – ксенографт. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$, шкала – 100 мкм.
Fig. 2. Representative photographs of histological structure of the mouse No. 2 organs. A – brain; B – heart; C – lung; D – spleen; E – kidney; F – liver; G – pancreas; H – intestine; I – mesentery; J – xenograft. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$, scale – 100 μm .

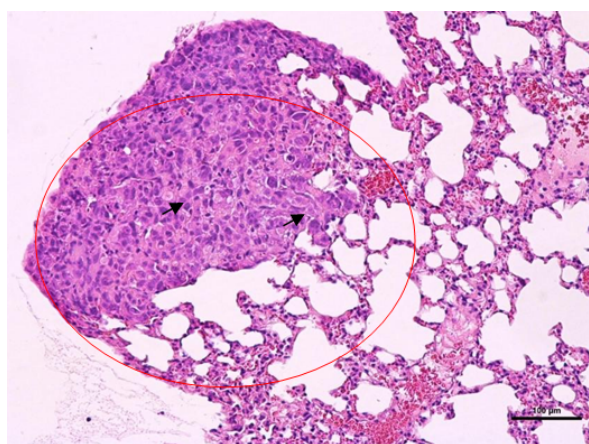


Рис. 3. Метастаз опухоли мыши №1 в перибронхиальной области легкого. Кровеносные сосуды в метастазе не визуализируются, патологические митозы отмечены стрелками. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$, шкала – 100 мкм.
Fig. 3. Metastasis of tumor of mouse No. 1 in the peribronchial region of the lung. Blood vessels in the metastasis are not visualized, pathological mitoses are indicated by arrows. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$, scale – 100 μm .

опухолевых узлов цвет был неизменен. Размеры опухолевых узлов составили: мышь №1 – $1,3 \times 0,9 \times 0,5$ см; мышь №2 – $1,5 \times 1,3 \times 0,7$ см; мышь №4 – $1,5 \times 1,2 \times 0,5$ см.

В результате иммуногистохимического исследования на наличие опухолевых клеток было установлено, что образцы ксенографтов всех животных были субтотально негативны к Cytokeratin 7. В толще опухоли встречались единичные слабо-позитивные клетки от 2% до 7% в разных образцах (рис. 5). При этом отмечено, что при окраске на общий Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) опухолевые клетки были позитивны на 100% (рис. 6).

При ИГХ окраске на СК7 была отмечена слабая положительная реакция на мембранных частях клеток, при ИГХ окраске на Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) реакция была ярко положительная (рис. 7). Инфильтрации в этой зоне в ткани легкого CD56⁺ клеток отмечено не было.

В результате проведения ИГХ исследования ксенографтов на наличие CD56-клеток

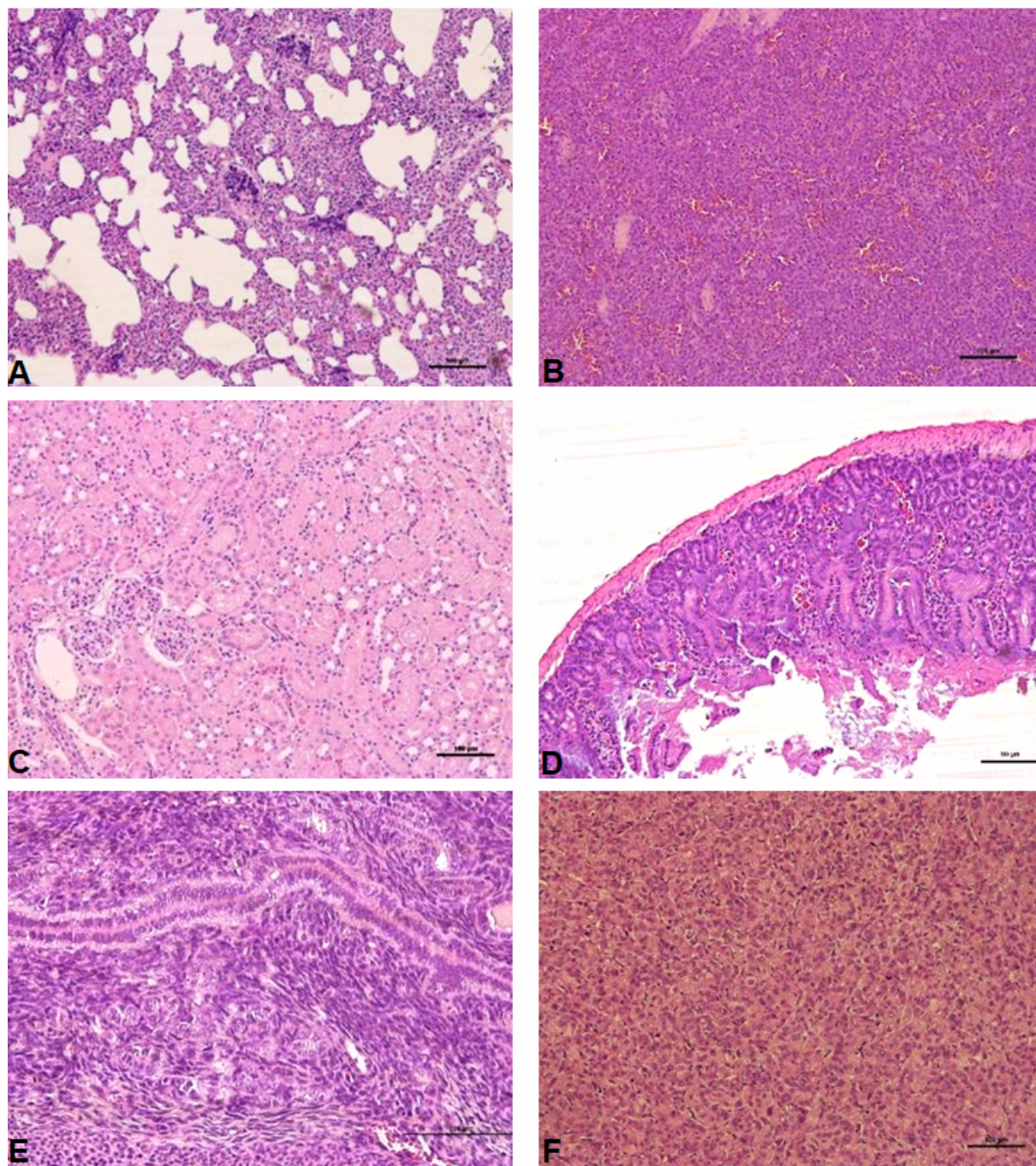


Рис. 4. Репрезентативные фотографии гистологического строения органов мыши №3. А – легкое; В – селезенка; С – почка; D – кишечник; E – матка; F – ксенографт. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$, шкала – 100 мкм.

Fig. 4. Representative photographs of the histological structure of the organs of mouse No. 3. A – lung; B – spleen; C – kidney; D – intestine; E – uterus; F – xenograft. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$, scale – 100 μm .

было установлено, что в 2/3 сосудов отмечалась равномерная ярко-позитивная иммунопероксидазная реакция на CD56 в цитоплазме клеток и гранулах, но без четкой визуализации границ клеток. В толще опухоли единичные рассеянные CD56⁺ клетки со слабо-позитивной реакцией на мембране (рис. 8).

При проведении ИГХ исследования ткани селезенки было установлено, что в части сосудов отмечается ярко-позитивная реакция на скопления клеток с CD56⁺ равномерно в цитоплазме и гранулами, но границы

клеток четко не визуализировались. В органах мышей №1 и №2 встречались небольшие скопления 3–5 клеток CD56⁺ с ярко-позитивной или умеренно-позитивной реакцией на мембране при увеличении $\times 100$, в органах мышей №3 и №4 скопления CD56⁺ клеток не визуализировались (рис. 9).

По данным проведенного гистологического исследования, присутствовали некрозы в образцах ксенографтов, визуализировалась мелкокапельная дистрофия онкоцитов, воспалительная инфильтрация и индекс ККО

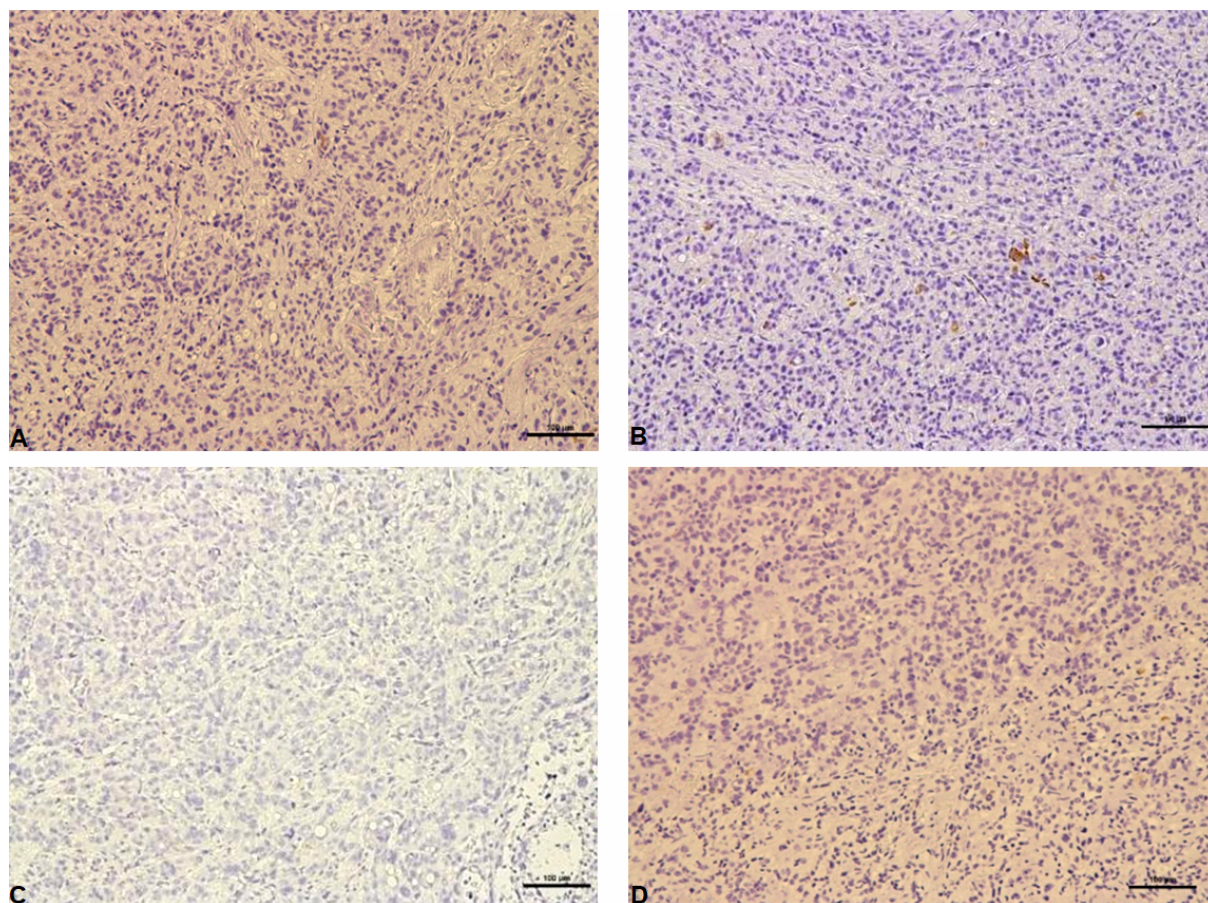


Рис. 5. Cytokeratin 7 в ткани ксенографтов исследуемых мышей, единичные коричневые позитивные клетки. А – мышь №1; В – мышь №2; С – мышь №3; D – мышь №4. Иммунопероксидазная реакция, $\times 100$, шкала – 100 мкм.

Fig. 5. Cytokeratin 7 in xenograft tissue of the studied mice, single brown positive cells. A – mouse No. 1; B – mouse No. 2; C – mouse No. 3; D – mouse No. 4. Immunoperoxidase reaction, $\times 100$, scale – 100 μm .

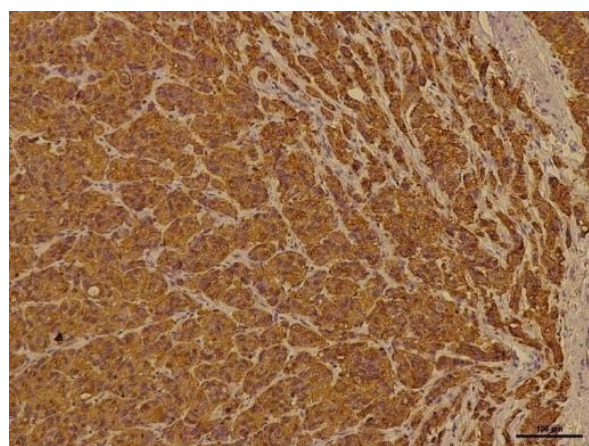


Рис. 6. Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) в ткани ксенографта мыши №1. Все опухолевые клетки позитивны, коричневое окрашивание. Иммунопероксидазная реакция, $\times 100$, шкала – 100 мкм.

Fig. 6. Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) in mouse xenograft tissue No. 1. All tumor cells are positive, brown staining. Immunoperoxidase reaction, $\times 100$, scale – 100 μm .

был меньше или равен 1,0, что в комплексе свидетельствует о слабо выраженных изменениях структуры опухоли (табл. 1).

Иммуногистохимия является важным вспомогательным методом для патологоанатомов, поскольку она специфически визуализирует распределение и количество определенного агента в ткани с помощью специфической реакции антиген-антитело. Уникальность метода ИГХ среди множества других лабораторных исследований заключается в том, что она проводится без разрушения гистологической архитектуры, что позволяет оценить паттерн экспрессии агента в условиях микроокружения [6, 17, 18]. В течение последних двух десятилетий использовались различные методы для выявления микрометастазов и изолированных опухолевых клеток (ИОК). Например, было предложено использовать множественные срезы лимфатических узлов с поэтапным разделением парафиновых блоков, а в качестве вспомогательных методов применять иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание эпителиальных или ассоциированных с опухолью антигенов, таких как цитокератин, раково-эмбриональный антиген и другие. Учитывая, что микрометастазы и ИОК не могут быть выявлены при окрашивании гематоксилином и эозином, но они потенци-

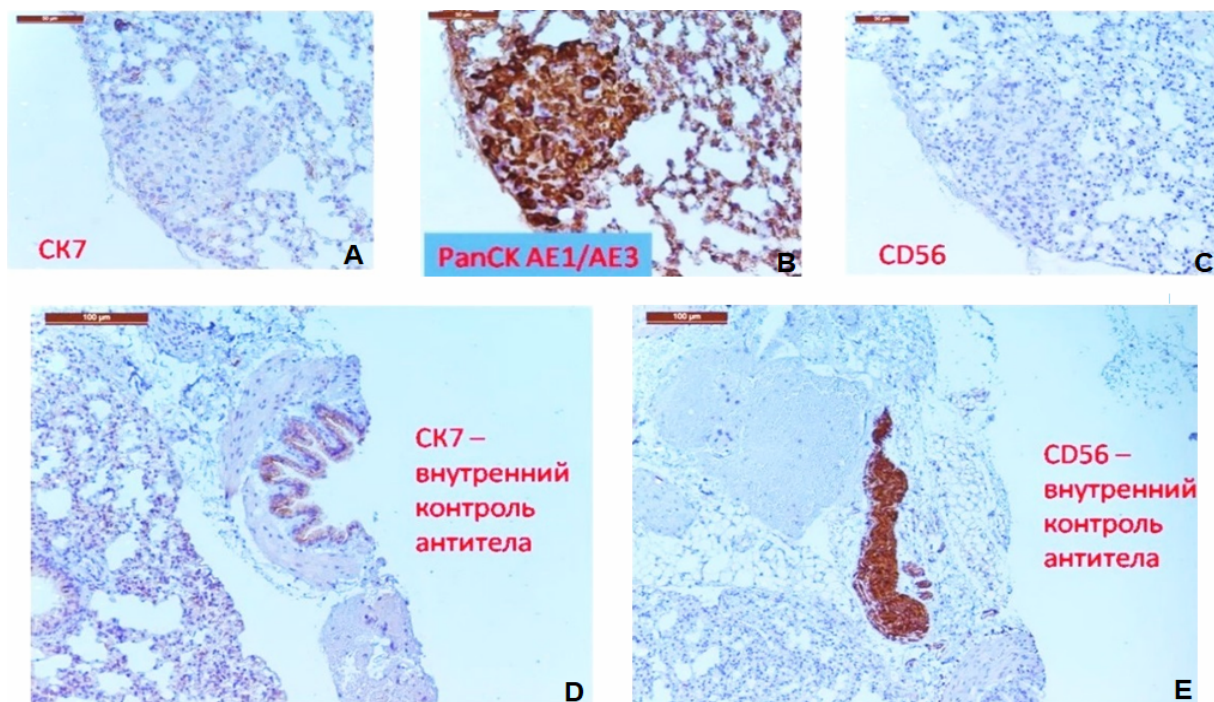


Рис. 7. Репрезентативные фотографии ткани легкого с метастазами мыши №2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CK7 (A), к PanCK AE1/AE3 (B), к CD56 (C); D – внутренний контроль антитела CK7; E – внутренний контроль антитела CD56. Коричневое окрашивание – позитивная реакция.

Fig. 7. Representative photographs of lung tissue with metastases from mouse No. 2. Immunohistochemical reaction with antibodies to CK7 (A), to PanCK AE1/AE3 (B), to CD56 (C); D – internal control for CK7 antibody; E – internal control for CD56 antibody. Brown staining indicates a positive reaction.

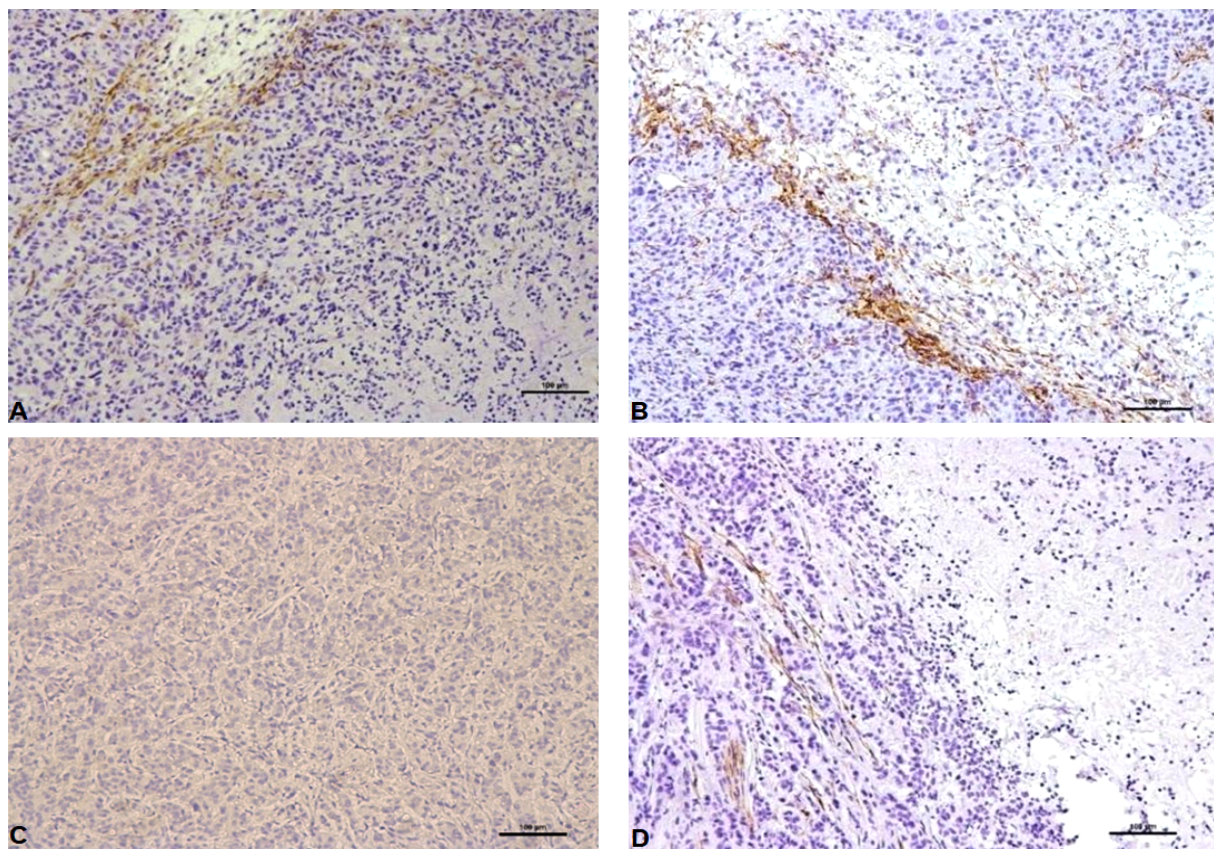


Рис. 8. CD56 в ткани ксенографтов исследуемых мышей. А – мышь №1; В – мышь №2; С – мышь №3; D – мышь №4. Коричневые тяжи – позитивные клетки крови в кровеносных сосудах и структурах в ткани ксенографта, а также единичные позитивные клетки. Иммунопероксидазная реакция, $\times 100$, шкала – 100 мкм.

Fig. 8. CD56 in xenograft tissues of mice. A – mouse No. 1; B – mouse No. 2; C – mouse No. 3; D – mouse No. 4. Brown strands are positive blood cells in the blood vessels and tissue structures of the xenograft, as well as single positive cells. Immunoperoxidase reaction, $\times 100$, scale – 100 μm .

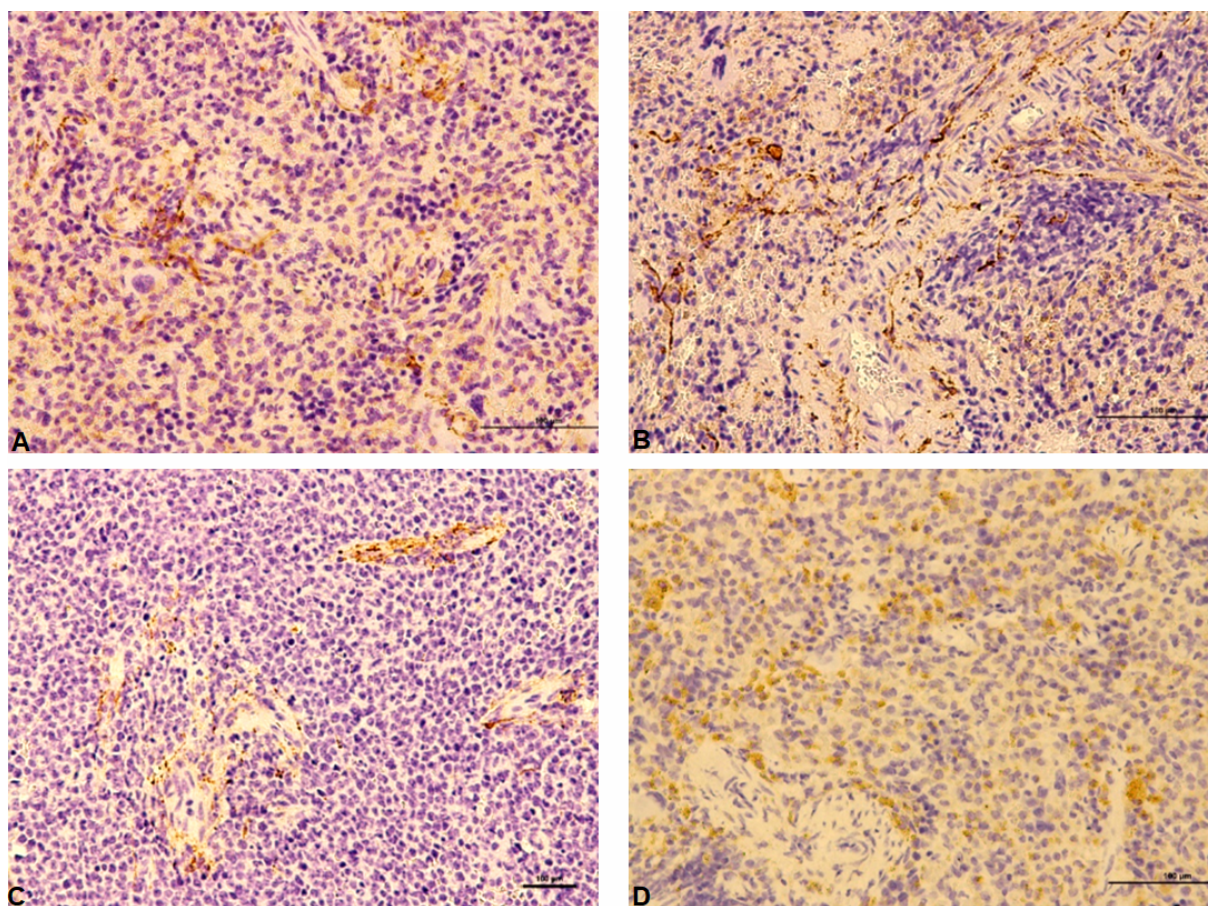


Рис. 9. CD56 в ткани селезенки исследуемых мышей. А – мышь №1; В – мышь №2; С – мышь №3; D – мышь №4. Коричневые тяжи – позитивная реакция на клетки крови в кровеносных сосудах и в тканях селезенки, а также единичные позитивные клетки. Иммунопероксидазная реакция, $\times 100$, шкала – 100 мкм.

Fig. 9. CD56 in the spleen tissue of the studied mice. A – mouse No. 1; B – mouse No. 2; C – mouse No. 3; D – mouse No. 4. Brown strands – positive reaction to blood cells in blood vessels and in spleen tissue, as well as single positive cells. Immunoperoxidase reaction, $\times 100$, scale – 100 μm .

ально могут быть идентифицированы при помощи ИГХ окрашивания с использованием антител против цитокератина. Авторы пришли к выводу, что изучение многоуровневых срезов, в частности, лимфатических узлов с использованием рутинного окрашивания гематоксилином и эозином и применение ИГХ-исследования с использованием эпителиальных маркеров цитокератинов при использовании по отдельности рассматриваются как ограниченно информативные методы, но могут быть достаточно эффективными при совместном применении [3].

Цитокератины представляют собой эпителиальный класс филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. По данным ряда исследований, наличие экспрессии цитокератина 7 является сильным отрицательным прогностическим индикатором, но экспрессия некоторых цитокератинов в опухолевых клетках может как увеличиваться, так и снижаться [9, 15]. Известно, что для каждого типа эпителия характерен свой набор цитокератинов, обеспечивающих нормальную архитектуру тканей, а также определенные межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия (контакты). Экспрессия цитокератинов непосред-

ственно связана с определением уровня дифференцировки клеток эпителия [7]. Цитокератин 7 обнаружен во многих протоковых и железистых эпителиях, включая легкие, молочную железу, яичники и эндометрий [9, 15]. Зарубежными авторами было установлено, что экспрессия цитокератина 7 была обнаружена в 22% образцов колоректальной аденокарциномы, в 80% аденокарциномы желудка и в 97% аденокарциномы поджелудочной железы [9]. Цитокератин 7 – базальный цитокератин, обнаруживаемый в большинстве железистых и переходных эпителиев. В нормальных тканях окрашивает большинство эпителиев, выстилающих протоки и железы, уротелий, альвеолярный эпителий, отсутствует в многослойном плоском эпителии, эпителии толстой кишки. При этом гепатоциты негативны, в то время как желчевыводящие протоки позитивны, также окрашивает эпителиальные опухоли яичника, молочной железы, аденокарциномы легкого, в то время как аденокарциномы толстой кишки негативны [2]. Согласно другим источникам, данные о частоте экспрессии цитокератина 7 значительно различались между исследованиями, эти противоречивые данные, возможно, вызваны

Таблица 1 / Table 1

Гистологическая характеристика ксенографтов. Патоморфоз, воспалительная инфильтрация, некрозы, апоптотический индекс, митотический индекс, коэффициент клеточного обновления
Histological characterization of xenografts. Pathomorphosis, inflammatory infiltration, necrosis, apoptotic index, mitotic index, cell renewal coefficient

№ мыши	Ксенографт, оценка в баллах							%		
	инфильтрация по границе	инфильтрация внутри	гигантские клетки опухоли	некрозы		пенистые МФ	мелкокапельная дистрофия онкоцитов	МИ	АИ	ККО
1	2	2	0	1	+ локальные, небольшие, ближе к краям	1	2	0,8	1	0,80
2	2	2	0	2	++ умеренный участок	1	2	0,8	1,6	0,50
4	2	3	0	2	++ умеренный участок	1	2	2	2	1,00
3	2	1	1	1	+ локальные, небольшие, ближе к краям	0	1	2,8	2,6	1,08

Примечание: инфильтрация по границе – воспалительная инфильтрация на границе ксенографта; инфильтрация внутри – воспалительная инфильтрация в толще опухоли; гигантские клетки опухоли – наличие гигантских многоядерных опухолевых клеток в толще ксенографта (в процессе лечения и после его завершения изменяется рост отдельных клеток в сторону гипертрофии и(или) атрофии, поэтому появление в опухоли гигантских одно- и многоядерных клеток является одним из ранних показателей лечебного патоморфоза); некрозы – от локальных до обширных участков некроза в толще опухоли; пенистые МФ – тип макрофагов, которые аккумулируют мелкие жировые капли в своей цитоплазме и могут быть связаны с прогрессированием опухоли; мелкокапельная дистрофия онкоцитов – жировая дистрофия онкоцитов, при которой в цитоплазме клеток появляются мелкие капли липидов; МИ – митотический индекс; АИ – апоптотический индекс; ККО – коэффициент клеточного обновления опухоли.

использованием различных протоколов окрашивания, антител и критериев интерпретации в этих исследованиях. Отмечено также, что иммуноокрашивание CK7 было отрицательным при аденокарциномах толстого кишечника и предстательной железы [15]. В нашем исследовании, в свою очередь, было установлено, что образцы ксенографтов рака поджелудочной железы человека (опухолевая линия AsPC-1) были негативны к Cytokeratin 7, но при окраске на общий Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) опухолевые клетки были позитивны на 100%.

При проведении иммуногистохимии различных видов аденокарцином авторами было установлено, что клетки компонента LCNEC (крупноклеточная нейроэндокринная карцинома) положительно окрашивались на CD56 и цитокератин (как мембранная, так и цитоплазматическая экспрессия). При иммуногистохимии образцов ксенографта мелкоклеточной карциномы MDA PCa 144-13 клетки демонстрировали фокальное точечное положительное окрашивание на цитокератины и

положительное окрашивание на синаптофизин, хромогранин и CD56 [8, 13]. По литературным данным CD56 (молекула адгезии нервных клеток / N-CAM) CD56 широко встречается в центральной нервной системе (нейроны и клетки глии), периферических нервах и скелетных мышцах, большинстве типов нейроэндокринных клеток и различных эпителиях (энтероцитах и новообразованных клетках желчных протоков), стромальных клетках яичников, гладкомышечных клетках матки и остеобластах у человека. Для исследования были представлены антитела к антигенам человека, однако, по данным базы данных генов, ген NCAM1 человека является ортологом гена мыши, и мы видим специфическую кросс-реактивность и окрашивание специфических структур в тканях мышей. Кроме того, стоит отметить, что такая яркая окраска части сосудов может быть связана с CD56+ клетками, которые находятся в кровотоке мыши или с их обломками, а также с «диффузией антигена». Таким образом, при анализе результатов ИГХ реакций мы оценивали

только визуализируемые клетки и группы клеток с очерченными границами. При изучении ксенографтов из линии клеток ASPC-1 было отмечено, что CD56⁺ клетки практически не визуализировались: наблюдались единичные слабо-позитивные CD56⁺ клетки, окрашивание мембраны которых было на грани видимости. Аналогичные результаты наблюдались и в селезенке, CD56⁺ клетки были единичные, также ярко-окрашивалась часть сосудов ксенографта и селезенки мыши (периферические нервные волокна, перициты). Зарубежными авторами при исследовании кинетики NK-клеток *in vivo* установлено, что клетки способны инфильтрировать опухоли уже через 3 часа после инъекции (FISH-анализ), наибольшая инфильтрация наблюдалась между 12 и 24 часами, а через 24 ч в опухоли начали проявляться некротические участки, вызванные уничтожением опухоли NK-клетками [16].

Заключение

В связи с существенным расширением спектра таргетных препаратов для лечения злокачественных новообразований возрастает и объем иммуногистохимических исследований по их тестированию. В результате проведенных исследований можно установить, что NK-клетки способны инфильтрировать ксенографты мышей, однако инфильтрация слабо выражена, что может быть связано с дозой или кратностью введения терапевтической суспензии. Воздействие агента повышает опухолевый патоморфоз, области некрозов увеличиваются, в то время как индекс клеточного обновления снижается. Отмечено также, что комплексная гистологическая и иммуногистохимическая оценка позволяет полноценно охарактеризовать как морфологические особенности опухоли, так и патоморфоз. На основании результатов проведенных исследований рекомендовано провести уточняющие эксперименты со сравнительной оценкой эффекта препарата при его использовании в различных дозах, режимах воздействия, на разных опухолях, а также временных точках эксперимента, с расширением спектра используемых иммуногистохимических сывороток.

Список источников / References

1. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции NK-клеток человека. Иммунология. 2012;33 (4):220–224. Abakushina EV, Kuz'mina EG, Kovalenko EI. Osnovnye svoystva i funktsii NK-kletok cheloveka. Immunologiya. 2012;33 (4):220–224. (In Russ.).
2. Артемьева А.С., Мурашкина А.А., Рогачев М.В. Иммуногистохимия: основы, методические подходы, группы маркеров: Учебное пособие. СПб.: 2020. 76.
3. Artem'eva AS, Murashkina AA, Rogachev MV. Immunogistokhimiya: osnovy, metodicheskie podkhody, gruppy markerov: Uchebnoe posobie. SPb.: 2020. 76. (In Russ.).
4. Алдущкина Ю.В., Анисимова Н.Ю., Грицай А.Н., Новрузов К.М., Должикова Ю.И., Одарюк О.А. и др. Клиническая значимость обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах при раке яичников. Российский биотерапевтический журнал. 2023;22(2):20–26. Aldushkina YuV, Anisimova NYu, Gritsai AN, Novruzov KM, Dolzhikova YuI, Odaryuk OA, et. al. Klinicheskaya znachimost' obnaruzheniya mikrometastazov v limfaticheskikh uzлах pri rake yaichnikov. Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal. 2023;22(2):20–26. (In Russ.). doi: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-20-26.
5. Болдышевская М.А., Таширева Л.А., Андрюхова Е.С., Дронова Т.А., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. Неструктурная роль цитокератинов при злокачественных новообразованиях. Успехи молекулярной онкологии. 2023;10:76–84. Boldyshevskaya MA, Tashireva LA, Andryukhova ES, Dronova TA, Vtorushin SV, Perel'muter VM. Nestruturnaya rol' tsitokeratinov pri zlokachestvennykh novoobrazovaniyakh. Uspekhi molekulyarnoi onkologii. 2023;10:76–84. (In Russ.). doi: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-76-85.
6. Боробова Е.А., Жеравин А.А. Натуральные киллеры в иммунотерапии онкологических заболеваний. Сибирский онкологический журнал. 2018;17(6):97–104. Borobova EA, Zheravin AA. Natural'nye killery v immunoterapii onkologicheskikh zabolevanii. Sibirskii onkologicheskii zhurnal. 2018;17(6):97–104. (In Russ.). doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-97-104.
7. Гуревич Л.Е., Казанцева И.А., Корсакова Н.А., Бобров М.А. Значение иммуногистохимии для таргетной терапии и прогнозирования в онкологии. Альманах клинической медицины. 2012;27:27–34. Gurevich LE, Kazantseva IA, Korsakova NA, Bobrov MA. Znachenie immunogistokhimii dlya targetnoi terapii i prognozirovaniya v onkologii. Al'manakh klinicheskoi meditsiny. 2012;27:27–34. (In Russ.).
8. Гуревич Л.Е., Корсакова Н.А., Воронкова И.А., Казанцева И.А., Ашевская В.Е., Титов А.Г., и др. Прогностическое и дифференциально-диагностическое значение экспрессии цитокератинов 7 и 19 и тиреоидного фактора транскрипции-1 в нейроэндокринных опухолях легких разной степени злокачественности. Альманах клинической медицины. 2016;44(5):613–23. Gurevich LE, Korsakova NA, Voronkova IA, Kazantseva IA, Ashevskaya VE, Titov AG, et. al. Prognosticheskoe i differentsial'no-diagnosticheskoe znachenie ekspressii tsitokeratinov 7 i 19 i tireoidnogo faktora transkripsii-1 v neuroendokrinnnykh opukholyakh legkikh raznoi stepeni zlokachestvennosti. Al'manakh klinicheskoi meditsiny. 2016;44(5):613–23. (In Russ.).
9. Aparicio A, Tzelepi V, Araujo JC, Guo CC, Liang S, Troncoso P, et. al. Neuroendocrine prostate cancer xenografts with large-cell and small-cell features derived from a single patient's tumor: morphological, immunohistochemical, and gene

- expression profiles. *Prostate*. 2011 Jun 1;71(8):846–56. doi: 10.1002/pros.21301.
9. Bayrak R, Haltas H, Yenidunya S. The value of CDX2 and cytokeratins 7 and 20 expression in differentiating colorectal adenocarcinomas from extraintestinal gastrointestinal adenocarcinomas: cytokeratin 7-/20+ phenotype is more specific than CDX2 antibody. *Diagn Pathol*. 2012 Jan 23;7:9. doi: 10.1186/1746-1596-7-9.
 10. Biassoni R. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol*. 2009; Chapter 14: 14.10.1–14.10.40. doi: 10.1002/cpim.47.
 11. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
 12. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018 Nov;18(11):671–688. doi: 10.1038/s41577-018-0061-z. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2018 Nov;18(11):726. doi: 10.1038/s41577-018-0077-4.
 13. DeLellis RA, Shin SJ, Treaba OD. Chapter 10: Immunohistology of endocrine tumors. In: Dabbs D. J., editor. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010;291–329. doi: 10.1016/B978-1-4160-5766-6.00014-5.
 14. Dobiasch S, Kampf S, Steiger K, Schilling D, Fischer JC, Schmid TE, et. al. Histopathological Tumor and Normal Tissue Responses after 3D-Planned Arc Radiotherapy in an Orthotopic Xenograft Mouse Model of Human Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 12;13(22):5656. doi: 10.3390/cancers13225656.
 15. Dum D, Menz A, Völkel C, De Wispelaere N, Hinsch A, Gorbokon N, et. al. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in cancer: A tissue microarray study on 15,424 cancers. *Exp Mol Pathol*. 2022 Jun;126:104762. doi: 10.1016/j.yexmp.2022.104762.
 16. Galli F, Rapisarda AS, Stabile H, Malviya G, Manni I, Bonanno E, et. al. In Vivo Imaging of Natural Killer Cell Trafficking in Tumors. *J Nucl Med*. 2015 Oct;56(10):1575–80. doi: 10.2967/jnumed.114.152918.
 17. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1361–1365. doi: 10.1126/science.aar6711.
 18. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016 Nov;50(6):411–418. doi: 10.4132/jptm.2016.08.08.
 19. Maskalenko NA, Zhigarev D, Campbell KS. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Aug;21(8):559–577. doi: 10.1038/s41573-022-00413-7.
 20. Parodi M, Astigiano S, Carrega P, Pietra G, Vitale C, Damele L, et. al. Murine models to study human NK cells in human solid tumors. *Front Immunol*. 2023 Jun 14;14:1209237. doi: 10.3389/fimmu.2023.1209237.
 21. Pergolini I, Morales-Oyarvide V, Mino-Kenudson M, Honselmann KC, Rosenbaum MW, Nahar S, et. al. Tumor engraftment in patient-derived xenografts of pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with adverse clinicopathological features and poor survival. *PLoS One*. 2017 Aug 30;12(8):e0182855. doi: 10.1371/journal.pone.0182855.
 22. Shin E, Bak SH, Park T, Kim JW, Yoon SR, Jung H, et. al. Understanding NK cell biology for harnessing NK cell therapies: targeting cancer and beyond. *Front Immunol*. 2023 Jul 18;14:1192907. doi: 10.3389/fimmu.2023.1192907.
 23. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1137–46. doi: 10.1172/JCI31405.
 24. Tarazona R., Lopez-Sejas N., Guerrero B., Hassoun F., Valhondo I., Pera A., et. al. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(5):879–899. doi: 10.1007/s00262-020-02532-9.
 25. Tseng WW, Winer D, Kenkel JA, Choi O, Shain AH, Pollack JR, French R, Lowy AM, Engleman EG. Development of an orthotopic model of invasive pancreatic cancer in an immunocompetent murine host. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 15;16(14):3684–95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2384.
 26. Wolf NK, Kissiov DU, Raulet DH. Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2023;2:90–105. doi: 10.1038/s41577-022-00732-1

Информация об авторах

Абакушина Елена Вячеславовна – д-р. мед. наук; ООО «Текон МП»; Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова; abakushina@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3881-3221
SPIN 7015-3946

✉ Степанова Ирина Анатольевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник; ООО «Текон МП»; Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова; ул. Дмитрия Ульянова, 11, Москва, 117292, Россия; IrinkaStepanova@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-1316-398X
SPIN 1354-6913

Румянцев Сергей Александрович – д-р. мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН; Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова; s_roumiantsev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-7418-0222
SPIN 1433-2016

Information about the authors

Elena V. Abakushina – Doct. Sci. (Med.), Tekon MP LLC; I.I. Dedov National Medical Research Center of Endocrinology; abakushina@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3881-3221
SPIN 7015-3946

✉ Irina A. Stepanova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Tekon MP LLC; I.I. Dedov National Medical Research Center of Endocrinology; ul. Dmitriya Ul'yanova, 11, Moscow, 117292, Russia; IrinkaStepanova@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-1316-398X
SPIN 1354-6913

Sergei A. Rumyantsev – Doct. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS; I.I. Dedov National Medical Research Center of Endocrinology; s_roumiantsev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-7418-0222
SPIN 1433-2016