



МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИТЕЛИЯ ВЕРХНЕГО ОТДЕЛА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА, ВОЗНИКАЮЩИХ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ПРОВОЦИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

В. Г. Шестакова¹, Л. И. Нигматуллина^{1,2}, И. Б. Атаджанов¹, С. А. Донсков¹,
Ю. В. Козловская¹, И. С. Долгополов¹, М. Ю. Рыков^{1✉}

1. Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация

2. Медикал Геномикс, г. Москва, Российская Федерация

✉ wordex2006@rambler.ru

Резюме

Цель исследования. Исследование морфологических характеристик изменений эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки, возникающих у экспериментальных животных в условиях провоцированного канцерогенеза.

Материалы и методы. Применен метод хронического эксперимента на животных: 40 самок нелинейных белых крыс, которые распределены на 4 равные группы ($n = 10$). Первая (I) и вторая (II) контрольная группы животных были подвержены механической травматизации слизистой оболочки полости рта с дополнительным аппликационным нанесением 0,9 % раствора NaCl и 1 % водного раствора диметилсульфоксида (DMSO) с частотой 2 раза в неделю. Третья группа животных – основная группа (4-NQO) – была подвержена механической травматизации слизистой оболочки полости рта с дополнительным аппликационным нанесением 1 % водного раствора DMSO, содержащий 0,1 мг/мл 4-нитрохинолин-N-оксид, с частотой 2 раза в неделю. Четвертая группа животных была интактной. На 1, 7, 10, 14 суток от начала эксперимента, а затем каждые 14 суток брали цитологический материал со слизистой полости рта и окрашивали по Папаниколау. Для сопоставления возникающих изменений изучали гистологическую картину органов верхнего отдела пищеварительной трубки.

Результаты. Животные из основной группы (4-NQO) демонстрировали отставание в наборе массы тела более стандартной дисперсии в контрольных (I и II) и интактной группе. Атипичные клетки неопределенной значимости появлялись в мазках начиная с 42 суток эксперимента. Начиная с 56 суток эксперимента в мазках, полученных от основной группы животных (4-NQO), обнаружены атипичные клетки (1–2 в поле зрения), описываемые в терминах Bethesda как внутриэпителиальные поражения низкой степени. Диагностически значимыми признавались парабазальные клетки плоского эпителия с атипичными крупными (более чем в 3 раза по сравнению с эталонными) ядрами, анизонуклеозом, с изменчивыми контурами ядерной мембраны в пределах одной клетки, грубодисперсным хроматином.

Заключение. Выраженность морфологических изменений в эпителии верхнего отдела пищеварительного тракта в направлении предракового состояния достоверно выше в основной группе при длительном воздействии канцерогенного фактора, по сравнению с контрольными и интактной группами ($p < 0,05$). Таким образом, была изучена и доказана эффективность моделирования условий провокации канцерогенеза эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки у экспериментальных животных с помощью механической травматизации слизистой оболочки полости рта с дополнительным аппликационным нанесением канцерогена (4-NQO). Данная модель провокации канцерогенеза будет использована в следующем исследовании неопластических процессов женской репродуктивной системы.

Ключевые слова:

злокачественные новообразования, пищеварительная система, цитология, эпителий, плоскоклеточная дисплазия, экспериментальная модель

Для корреспонденции:

Рыков Максим Юрьевич – д.м.н., доцент, проректор по научной работе и инновационной деятельности, заведующий кафедрой онкологии факультета дополнительного профессионального образования, директор Института персонализированной онкологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация.

Адрес: 170100, Российская Федерация, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

E-mail: wordex2006@rambler.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8398-7001>

SPIN: 7652-0122, AuthorID: 724128

ResearcherID: R-9768-2016

Scopus Authors ID: 57190262153

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Шестакова В. Г., Нигматуллина Л. И., Атаджанов И. Б., Донсков С. А., Козловская Ю. В., Долгополов И. С., Рыков М. Ю. Морфологическая характеристика изменений эпителия верхнего отдела пищеварительного тракта, возникающих у экспериментальных животных в условиях провоцированного канцерогенеза. Исследования и практика в медицине. 2022; 9(1): 43-53. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-1-4>.

Статья поступила в редакцию 27.09.2021; одобрена после рецензирования 27.01.2022; принята к публикации 14.03.2022.

© Шестакова В. Г., Нигматуллина Л. И., Атаджанов И. Б., Донсков С. А., Козловская Ю. В., Долгополов И. С., Рыков М. Ю., 2022

CYTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS FOR PROVOKED LESIONS OF SQUAMOUS EPITHELIA OF DIGESTIVE SYSTEM IN ANIMAL MODELS

V. G. Shestakova¹, L. I. Nigmatullina^{1,2}, I. B. Atadzhanov¹, S. A. Donskov¹, Yu. V. Kozlovskaya¹,
I. S. Dolgoplov¹, M. Yu. Rykov¹✉

1. Tver State Medical University, Tver, Russian Federation

2. Medical Genomics, Moscow, Russian Federation

✉ wordex2006@rambler.ru

Abstract

Purpose of the study. Investigation of morphological characteristics of changes in the epithelium of foregut in experimental animals put under conditions of provoked carcinogenesis.

Materials and methods. The method of chronic experiment on animals is applied: 40 female non-linear white rats, which are divided into 4 equal groups ($n = 10$). The first (I) and second (II) control groups of animals were exposed to mechanical trauma of the oral mucosa with additional application of 0.9 % NaCl solution and 1 % aqueous dimethyl sulfoxide (DMSO) solution with a frequency of 2 times a week. The third group of animals, i.e. the main group (4-NQO), was subjected to mechanical traumatization of the oral mucosa with additional application of 1 % DMSO aqueous solution containing 0.1 mg/ml of 4-nitroquinoline-N-oxide, with a frequency of 2 times a week. The fourth group of animals was intact. On the 1st, 7th, 10th, 14th day from the beginning of the experiment, and then every 14 days, cytological material was taken from the oral mucosa and stained with Papanicolaou stain. To compare the emerging changes, the histological picture of the organs of the foregut was studied.

Results. Animals from the main group (4-NQO) showed a lag in body weight gain over the standard variance in the control (I and II) and intact groups. Atypical cells of indeterminate significance appeared in smears starting from 42 days of the experiment. Starting from the 56th day of the experiment, atypical cells (1–2 in the field of view), described in Bethesda terms as low-grade intraepithelial lesions, were detected in smears obtained from the main group of animals (4-NQO). Parabasal cells of the squamous epithelium with atypical large (more than 3 times compared to the reference) nuclei, anisonucleosis, with variable contours of the nuclear membrane within one cell, coarse chromatin were recognized as diagnostically significant.

Conclusion. The severity of morphological changes in foregut epithelium in the direction of the precancerous state is significantly higher in the main group with prolonged exposure to carcinogenic factor, compared with the control and intact groups ($p < 0.05$). Thus, the effectiveness of modeling the conditions of provocation of carcinogenesis of the epithelium of the upper digestive tube in experimental animals was studied and proved by mechanical traumatization of the oral mucosa with additional application of carcinogen (4-NQO). This model of provocation of carcinogenesis will be used in the next study of neoplastic processes of the female reproductive system.

Keywords:

malignant tumors, cytology, intraepithelial lesions, squamous dysplasia, digestive system, animal models

For correspondence:

Maksim Yu. Rykov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Vice-Rector for Research and Innovation, Head of the Oncology Department of the Faculty of Additional Professional Education, Director of the Institute of Personalized Oncology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation.

Address: 4 Sovetskaya str., Tver 170100, Russian Federation

E-mail: wordex2006@rambler.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8398-7001>

SPIN: 7652-0122, AuthorID: 724128

ResearcherID: R-9768-2016

Scopus Authors ID: 57190262153

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Shestakova V. G., Nigmatullina L. I., Atadzhanov I. B., Donskov S. A., Kozlovskaya Yu. V., Dolgoplov I. S., Rykov M. Yu. Cytopathological characteristics for provoked lesions of squamous epithelia of digestive system in animal models. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2022; 9(1): 43-53. (In Russ.). <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-1-4>.

The article was submitted 27.09.2021; approved after reviewing 27.01.2022; accepted for publication 14.03.2022.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные плоскоклеточные новообразования полости рта и глотки встречаются в 0,7 % случаев среди мужчин и 0,09 % среди женщин [1]. В России количество больных злокачественными новообразованиями орофациальной области составляет около 2 % от общего количества больных злокачественными новообразованиями [2].

Частой формой злокачественных новообразований слизистой оболочки полости рта, глотки и пищевода является плоскоклеточная карцинома. Поиск и изучение общих морфологических и иммунологических маркеров малигнизации, диагностических предвестников инвазии и метастазирования неотъемлемо связан с разработкой надежных диагностических протоколов для ранней диагностики опухолевых заболеваний слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительной трубки [3].

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике рака слизистой оболочки полости рта, пациенты с подозрением на неопластические изменения направляются профильными специалистами первичного звена на дополнительные консультации [4; 5]. Несмотря на рекомендации по взятию первичного диагностического материала во время первого визита пациента, отсутствуют единые подходы к подготовке материала, его транспортировке и преаналитической обработке. В то же время цитологический материал может предоставлять диагностически значимые морфологические данные. Наиболее простые методы подготовки материала к исследованию, такие как окраска по Романовскому-Гимзе, Паппенгейму, Папаниколау и другие, потенциально доступны всем лабораториям патологоанатомических отделений [6]. Цитологический материал также может быть пригоден для ультраструктурного анализа, изучения иммунологического профиля [7]. В пилотных исследованиях показано, что для рака полости рта могут быть использованы диагностические критерии Bethesda – универсальной системы интерпретации и оценки результатов цитологических исследований [8]. Однако, отсутствие единой системы классификации изменений, обнаруживаемых врачом в цитологических мазках, существенно ограничивает возможности ранней диагностики с использованием малоинвазивных методов. Рядом отечественных авторов отмечены важные детали цитопатологической картины, связанной с метаплазией плоского эпителия пищевода [7]. Дальнейшие исследования в этой области позволят создать представление об общих свойствах измененных клеток плоских эпителиев.

Цель исследования: исследование морфологической характеристики изменений эпителия верхнего

отдела пищеварительной трубки, возникающих у крыс в условиях провоцированного канцерогенеза при воздействии субстанций с доказанной канцерогенной активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.), в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г.), в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Межгосударственный стандарт, 2016 г.). Ведение первичной документации осуществлялось в соответствии с принципами Надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33044-2014, Россия). На проведение исследования получено разрешение локального Этического комитета Тверского ГМУ (от 11.05.2018 г.).

Материалом для исследования послужили 40 самок нелинейных белых крыс в возрасте 6 недель к началу эксперимента. Перед началом эксперимента животные выдерживались в 14-дневном карантине. Крысы были распределены на 4 равные группы ($n = 10$). Первой контрольной группе ингаляционно проводили эфирную седацию и механическую скарификационную микротравматизацию слизистой полости рта, а затем аппликационно наносили 0,9 % раствор NaCl с частотой 2 раза в неделю. Второй контрольной группе аналогично после седации травмировали слизистую полости рта и аппликационно наносили 1 % водный раствор диметилсульфоксида (DMSO) с той же частотой. Крысам основной (третьей) группы после седации и травматизации слизистой полости рта аппликационно наносили 1 % водный раствор DMSO, содержащий 0,1 мг/мл 4-нитрохинолин-N-оксида (4-NQO) с частотой 2 раза в неделю. Четвертая группа крыс была интактной и принималась за эталон для данного исследования. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Кормление осуществлялось комбикормом для лабораторных животных. Для питья использовалась вода питьевая по СанПиН 2.1.3684-21.

На 1, 7, 10, 14 сутки от начала эксперимента, а затем каждые 14 суток методом мацерации зондом-цитощеткой типа D1 брали материал для цитологического исследования. Влажные мазки-отпечатки эпителия полости рта фиксировали в абсолютном

спирте, гидратировали в спиртах нисходящей концентрации и дистиллированной воде, окрашивали по Папаниколау (гематоксилином Гилла, цитоплазматическими красителями OG6 и EA50), дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и просветляли в двух сменах ксилола.

Животных выводили из эксперимента при снижении массы тела более чем на 1/3 или отставании в наборе веса более чем на 1/3 по сравнению с интактной группой. Вне указанных критериев эквивалентное число животных из контрольных и интактной групп также выводили из эксперимента на 42 и 70 сутки соответственно основной группе. Эвтаназию животных осуществляли в следующей последовательности: эфирная седация, подкожное введение Золетила-100 и Ксиланита в дозах 8 мг/кг и 4 мг/кг соответственно, обеспечение сосудистого доступа (пункцией дорзальной хвостовой вены) и введение Лидокаина в дозировке 100 мг/кг. После трехкратного определения остановки кровообращения приступали к аутопсии. Предельным временем от момента клинической смерти до начала фиксации гистологического материала считали 30 мин. [9].

Полученный аутопсийный материал фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, дегидратировали в 8 сменах изопропанола, начиная с 50 % водного раствора изопропанола, заливали в парафиновую среду Гистомикс с использованием заливочного модуля ESD-2800. Тонкие парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм, полученные на полуавтоматическом ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое изучение полученного экспериментального материала проводили с помощью микроскопа на малом ($\times 10$), большом ($\times 40$) увеличениях и в масляной иммерсии ($\times 100$). Микрофотографии получали цифровой фотокамерой, компьютерная обработка полученных снимков осуществлялась в ПО MCview.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 13 (TIBCO Software Inc.). Расчет средней, медианы, стандартных ошибок и доверительных интервалов проводили с использованием описательных статистик программы. Для оценки нормальности распределения анализируемых количественных показателей использовали тест Шапиро-Уилка ($n < 50$). Совокупности учитываемых переменных согласно тесту, не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для их дальнейшего анализа использовали непараметрические тесты. Изменение средней по группам массы тела животных и ее доверительный интервал определяли при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. При сравнении частот встречаемости цитопатологических изменений в экспериментальных группах использовали H-критерий Краскелла-Уоллиса.

При уровне значимости $p < 0,05$ различия в сравниваемых группах рассматривались как статистически значимые. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами дополнительно проводилось попарное сравнение при помощи точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения массы тела животных приведены на рисунке 1. Статистически значимые ($p < 0,05$) различия в массах тела животных между экспериментальными группами получены на 28 сутки эксперимента. Животные из основной группы (4-NQO) демонстрировали отставание в наборе массы тела более стандартной дисперсии в контрольных и интактной группе. К 42 суткам одно животное из основной группы «4-NQO» было выведено из эксперимента и подвергнуто эвтаназии в связи с отстава-

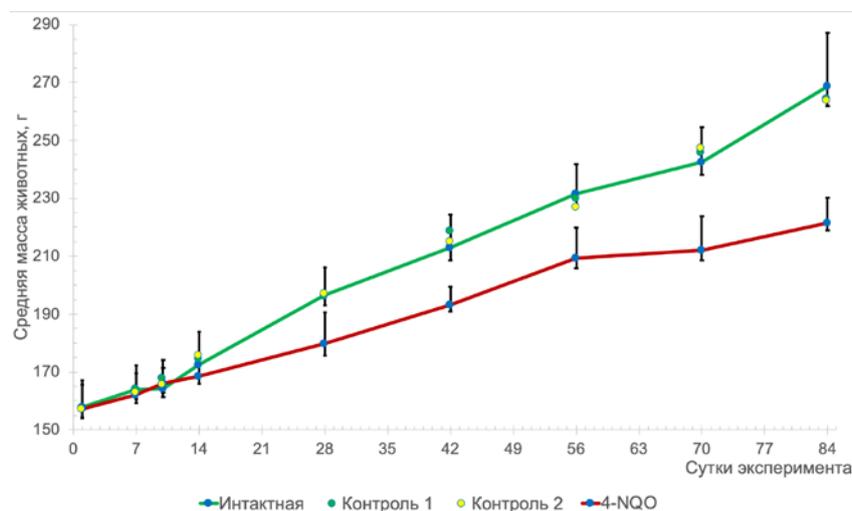


Рис. 1. Изменение средней по группам массы тела животных в течение эксперимента. Для интактной группы и основной группы «4-NQO» приведены доверительные интервалы при уровне статистической значимости 95 %. Статистически значимые различия между указанными группами наблюдались начиная с 28 суток эксперимента.

Fig. 1. Change in the average body weight of animals for groups during the experiment. For the intact group and the "4-NQO" main group, confidence intervals are given at a statistical significance level of 95 %. Statistically significant differences between the indicated groups were observed starting from the 28th day of the experiment.

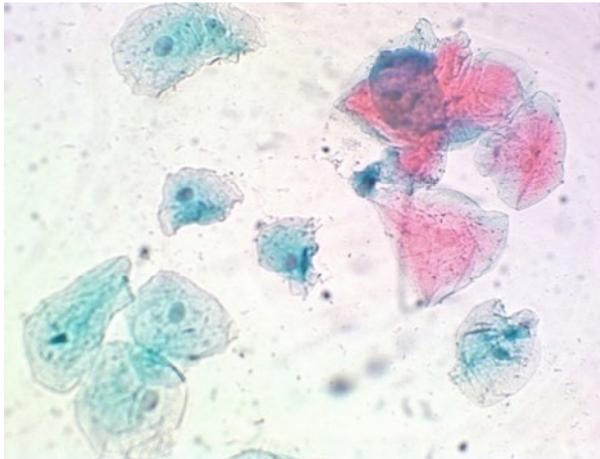


Рис. 2. Мазок эпителия полости рта крыс интактной группы на 10 сутки эксперимента. Традиционный препарат. Окраска по Папаниколу. Увеличение: × 980. Заключение по Bethesda: интраэпителиальные поражения отсутствуют.

Fig. 2. Smear of the oral cavity epithelium of intact rats on the 10th day of the experiment. Pap test. Magnification: × 980. Bethesda Conclusion: No intraepithelial lesions.

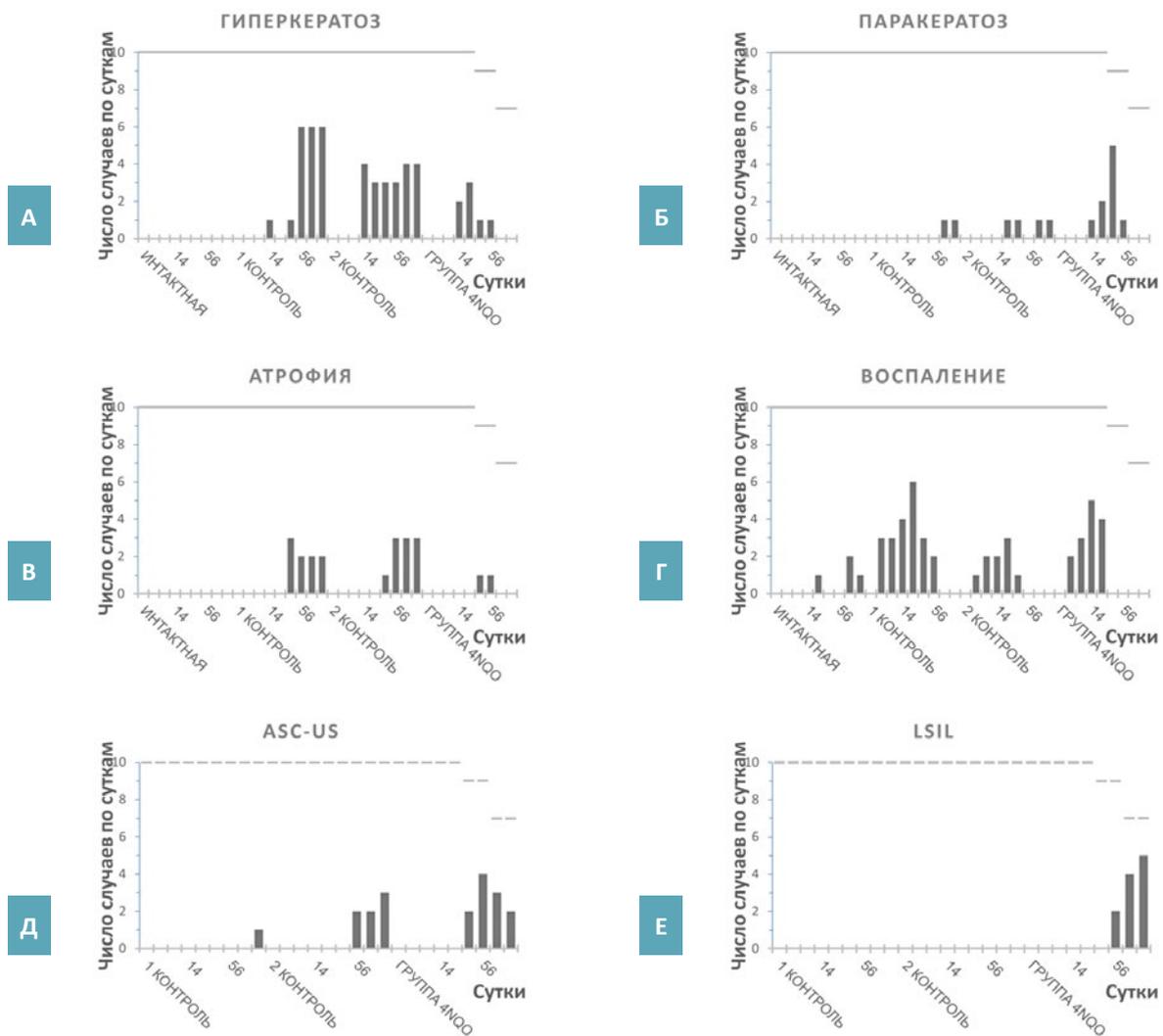


Рис. 3. Абсолютные частоты встречаемости цитопатологических изменений по экспериментальным группам. а – Гиперкератоз, б – Паракератоз, в – Атрофия, г – Воспаление, д – ASC-US – атипичные клетки плоского эпителия неопределенной значимости, е – LSIL – внутриэпителиальные поражения низкой степени. Пунктирной линией указано общее число животных на сутки эксперимента.

Fig. 3. The absolute frequency of occurrence of cytopathological changes in the experimental groups. a – Hyperkeratosis, b – Parakeratosis, c – Atrophy, d – Inflammation, e – ASC-US – atypical squamous epithelial cells of undetermined significance, f – LSIL – low-grade intraepithelial lesions. The dotted line indicates the total number of animals on the day of the experiment.

нием в наборе массы тела более чем на 1/3 среднего значения для интактной группы. К 70 суткам по тем же критериям были выведены из эксперимента еще двое животных из основной группы «4-NQO». При попарном сравнении средних масс тела животных методом Фишера выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) различия между основной группой «4-NQO» и остальными группами к концу эксперимента.

При анализе и интерпретации результатов цитологических исследований использовались диагностические и классификационные критерии системы Bethesda в части, применимой в отношении многослойных плоских эпителиев [10]. Помимо этого, для составления общего представления о цитологической картине, анализировалась картина условной нормы, характерной для интактной группы. Типичная для данного вида животных нормальная цитологическая картина представлена на рисунке 2. В мазках

обнаруживались парабазальные и промежуточные клетки плоского эпителия. Клетки округлой или полигональной формы, напластывались на стекло вследствие чего их цитоплазма выглядела складчатой. Ядра имели ровные контуры, примерно одинаковые размеры, хроматин равномерно дисперсный, в некоторых ядрах обнаруживались ядрышки. В цитоплазме отдельных промежуточных клеток обнаруживались включения гликогена. На рисунке 2 и на других микрофотографиях цитологических препаратов на фоне присутствуют неспецифические артефакты преаналитического этапа: слизь, флора и фрагменты растительных пищевых волокон. Они игнорировались, пока не препятствовали адекватной оценке препарата.

Характер и частота встречаемости цитопатологических изменений, выявляемых в мазках эпителия, суммированы на рисунке 3. Статистически значимые (H-критерий Краскелла-Уоллиса) различия по



Рис. 4. Мазок эпителия полости рта крыс III группы на 42 сутки эксперимента. Традиционный препарат. Окраска по Папаниколау. Увеличение: $\times 2450$. Заключение по Bethesda: атипичные клетки плоского эпителия неопределенного значения (ASC-US), атипичный паракератоз.

Fig. 4. Smear of the oral cavity epithelium of rats of group III on the 42nd day of the experiment. Traditional drug. Pap test. Magnification: $\times 2450$. Bethesda Conclusion: Undefined atypical squamous epithelial cells (ASC-US), atypical parakeratosis.

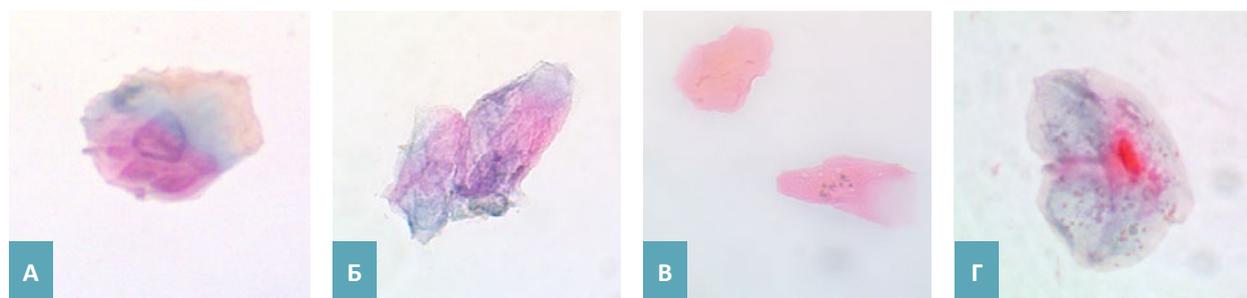


Рис. 5. Мазок эпителия полости рта крыс III группы на 56 сутки эксперимента. Традиционный препарат. Окраска по Папаниколау. Увеличение: а, б, г – $\times 2450$, в – $\times 980$. Заключение по Bethesda: плоскоклеточное эпителиальное поражение низкой степени (LSIL).

Fig. 5. Smear of the oral cavity epithelium of rats of group III on the 56th day of the experiment. Traditional drug. Pap test. Magnification: а, б, d – $\times 2450$, с – $\times 980$. Bethesda Conclusion: Low Grade Squamous Epithelial Injury (LSIL).

абсолютным частотам встречаемости изменений выявлены между основной группой «4-NQO» и контрольными ($p = 0,031$ для I контрольной и $p = 0,027$ для II контрольной), а также интактной ($p = 0,005$) группами. Методом Фишера установлено, что значимым можно считать различия в частотах встречаемости атипии плоского эпителия между основной группой «4-NQO» и другими экспериментальными группами на 42 сутки эксперимента. Кератотические и воспалительные изменения являлись неспецифическими для основной группы «4-NQO» и встречались во всех экспериментальных группах, в которых производилась механическая травматизация слизистой полости рта. Различия в частоте встречаемости цитопатологических изменений, классифицируемых как атипия плоского эпителия неопределенной значимости, в группах основной «4-NQO» и II контрольной статистически значимы при анализе с применением точного теста Фишера ($p = 0,015$).

Атипия плоского эпителия, выявленная при исследовании цитологического материала, представлена на рисунках 4 и 5. Атипичные клетки неопределенной значимости появлялись в мазках начиная с 42 суток эксперимента (рис. 4). Согласно критериям Bethesda, такими клетками признавались зрелые клетки плоского эпителия с гиперхромными пикнотическими ядрами с неровными контурами (рис. 4а), хроматин

имел грубую структуру, в отдельных клетках наблюдалась дистрофическая вакуолизация (рис. 4в). Ядра парабазальных клеток были крупнее эталонных более чем в 2 раза, с неровными контурами, изрезанной ядерной мембраной, создающей ощущение складчатости ядра (рис. 4б). Парабазальные и зрелые клетки плоского эпителия образовывали пласты. В дальнейшем были отмечены качественные изменения в мазках от тех же животных, интерпретированные нами как прогрессирование процессов.

Начиная с 56 суток эксперимента в мазках, полученных от животных основной группы «4-NQO», обнаружены атипичные клетки, описываемые в терминах Bethesda как внутриэпителиальные поражения низкой степени. Диагностически значимыми признавались парабазальные клетки плоского эпителия с атипичными крупными (более чем в 3 раза по сравнению с эталонными) ядрами, анизонуклеозом, с изменчивыми контурами ядерной мембраны в пределах одной клетки, грубодисперсным хроматином (рис. 5а). Цитоплазма парабазальных клеток с оранжевофильными участками отражала кератинизацию (рис. 5б, г). В зрелых клетках обнаруживались признаки атипичного паракератоза и дистрофической вакуолизации (рис. 5в).

Результаты гистологической верификации предполагаемых изменений приведены на рисунке 6.

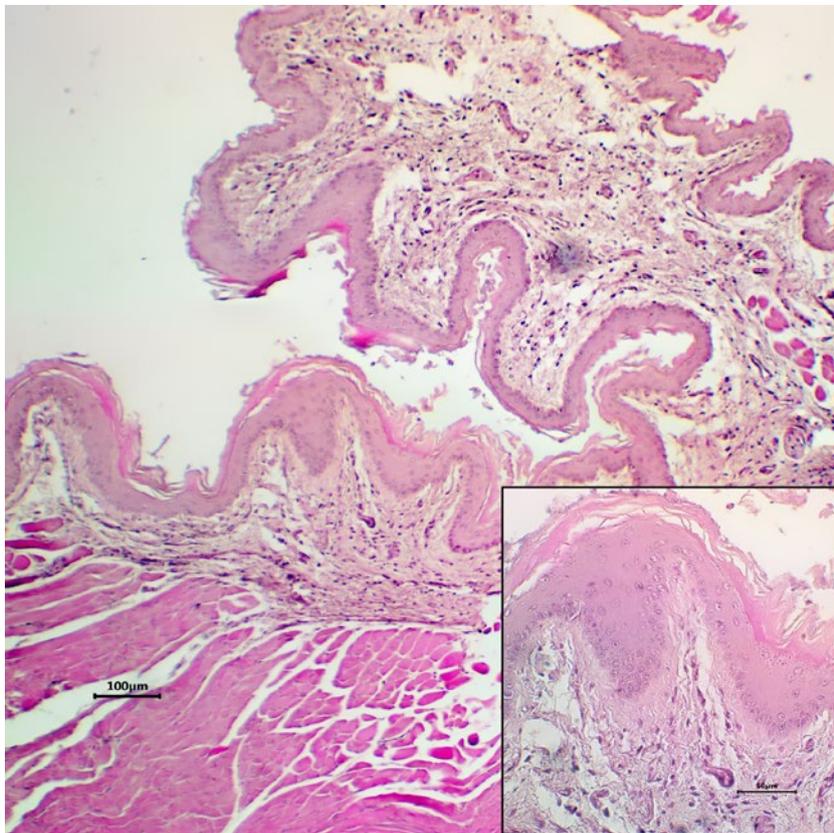


Рис. 6. Умеренные (grade 2) диспластические изменения многослойного плоского эпителия пищеварительного тракта. Тонкий срез средней трети пищевода. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 245$, в выделенном окне – $\times 980$.

Fig. 6. Moderate (grade 2) dysplastic changes in the squamous epithelium of the digestive tract. Thin section of the middle third of the esophagus. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification: $\times 245$, in the selected window – $\times 980$.

В средней трети пищевода выявлена дезорганизация плоского эпителия, включающая нарушения гистоархитектоники, полярности клеток, ядерный полиморфизм, местами паракератоз. Стромальные реакции включали умеренную лимфо-гистиоцитарную инфильтрацию и мукоидное набухание. Контрольная гистологическая картина показана на рисунке 7. Эпителий без признаков диспластических изменений. Реакция стромы отсутствует. Патологических изменений не выявлено. Отделение эпителиального пласта с подслизистой основой от мышечной оболочки обусловлено сокращением последней вследствие наступившего трупного окоченения (артефакт фиксации).

Таким образом, возникновение диспластических изменений плоского эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки у крыс группы с экспозицией 4-нитрохинолин-N-оксида происходит в среднем к 70 суткам эксперимента. Цитологические изменения, соответствующие внутриэпителиальным поражениям низкой степени, коррелируют с гистологической картиной умеренных диспластических изменений эпителиев верхнего отдела пищеварительной трубки.

ОБСУЖДЕНИЕ

4-NQO – гидрофильное производное нитрохинолина, применяемое в экспериментальной практике в качестве мутагена, формирующего ДНК-аддукты (нековалентно связанные супермолекулярные ассоциаты) и вызывающего хромосомные aberrации. В частности, 4-NQO используют для экспериментального моделирования рака языка на крысах [10]. Существуют данные о его токсическом действии. Минимальной токсической дозой при аппликационном пути введения через слизистую полости рта исследователи называют 20 мг/кг для крыс [11; 12].

DMSO, известный под торговым наименованием «Димексид», является амфифильным апротонным растворителем, смешивающимся с водой в любых соотношениях. В медицине его применяют как противовоспалительное, обезболивающее средство, транспортную систему для доставки лекарств. В медико-биологических и медико-токсикологических исследованиях используется свойство DMSO усиливать проницаемость биологических барьеров для ксенобиотиков. Токсическими дозами, оказывающими системное действие, считаются очень высокие концентрации DMSO; в исследованиях показаны эффекты при дозах порядка 10^3 – 10^5 мг/кг [6].

Установлено, что в эксперименте возникновение диспластических изменений плоского эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки происходит в среднем к 70 суткам эксперимента. Достаточным для интерпретации патологических изменений как ранней дисплазии мы считаем цитопатологическое заключение LSIL в терминах Bethesda. Морфологическими критериями отнесения выявленных патологических изменений к интраэпителиальным поражениям и дисплазии низкой степени являются: изменение размеров, формы, контуров ядер, ядерно-цитоплазматического соотношения; нарушения созревания и дифференцировки клеток, нерегулярность морфологии базального слоя, нарушения гистоархитектоники клеток [13]. Кроме того, указанные критерии могут выступать и в качестве прогностических маркеров для стадирования патологического процесса в ходе серийных исследований, определения вероятной инвазии и метастазирования. В связи с этим мы исходим из положения, что для верификации цитопатологических заключений необходимо использовать маркеры клеточных взаимодействий, клеточной адгезии и миграции. Для дальнейшего

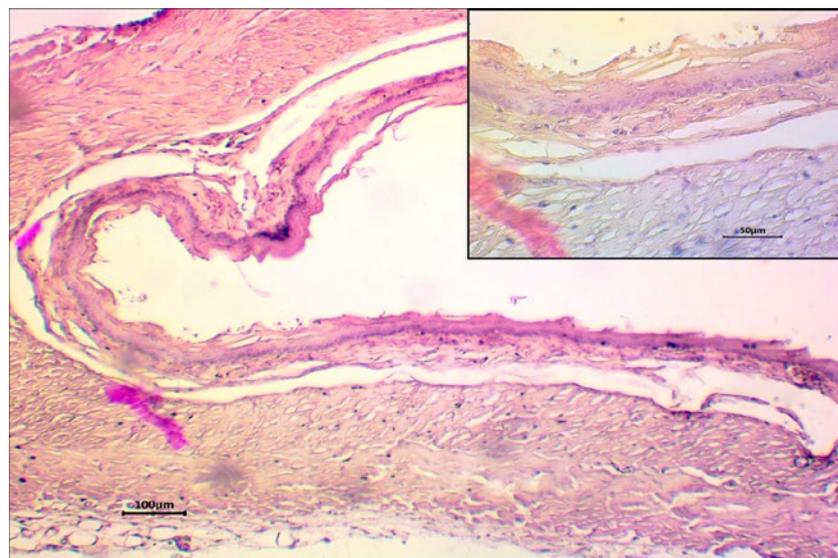


Рис. 7. Контрольный аутопсийный материал. Тонкий срез средней трети пищевода. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 245$, в выделенном окне – $\times 980$.

Fig. 7. Control autopsy material. Thin section of the middle third of the esophagus. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification: $\times 245$, in the selected window – $\times 980$.

изучения патоморфологической картины диспластических изменений необходимо применение методов иммуноцитологического и гистохимического исследования. Мы полагаем, что перспективными в этом отношении иммуноцитохимическими маркерами являются цитокератины и гликопротеины семейства CD44.

Показано, что экспрессия белков плотных контактов, коннексинов, клаудинов, E-кадгерина изменяется при эндометриозе и опухолевых заболеваниях эндометрия [14]. Нами исследуется возможность использования соответствующих иммунохимических маркеров для ранней диагностики внутриэпителиальных неоплазий верхнего отдела пищеварительной трубки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитологическая картина при воздействии «4-NQO» характеризуется воспалением, гипер- и паракератозом

и четко коррелирует с гистологической картиной формирования диспластических изменений эпителия, подвергшегося топическому воздействию канцерогена. Выраженность морфологических изменений в плоском эпителии верхнего отдела пищеварительного тракта в направлении предракового состояния достоверно выше в основной группе при длительном воздействии канцерогенного фактора, по сравнению с контрольными и интактными группами ($p < 0,05$). Таким образом, была изучена и доказана эффективность моделирования условий провокации канцерогенеза эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки у экспериментальных животных с помощью механической травматизации слизистой оболочки полости рта с дополнительным аппликационным нанесением канцерогена (4-NQO). Данная модель провокации канцерогенеза будет использована в следующем исследовании неопластических процессов женской репродуктивной системы.

Список источников

1. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А. Д., Старинского В. В., Шахзадовой А.О., 2020, 252 с.
2. Храмов Д. А., Хвостовой Д. В., Рыжаев В. А. Распространенность злокачественных новообразований структур полости рта. *Авиценна*. 2021;(78):37–38.
3. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020 Mar;42(3):539–555. <https://doi.org/10.1002/hed.26006>
4. Злокачественные новообразования полости рта: клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации: официальный сайт. Доступно по: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/164>. Дата обращения: 12.08.2021.
5. Иконникова А. В., Джураева Ш. Ф. Онконастороженность врачей-стоматологов: вопросы первичной диагностики рака языка. *Современная стоматология*. 2019;(2(75)):46–48.
6. Shulyak AV, Gusakovskiy SS, Grygorenko VN, Goydyk VS, Mytsik YO, Badiuk NS. Modern aspects of the use of Dimethyl sulfoxide (DMSO). *PharmacologyOnline*. 2021;1:82–89.
7. Шапиро Н. А., Шибанова А. И., Елеубаева Ж. Б. Цитологическая диагностика заболеваний пищевода, желудка и кишки: цветной атлас. М., Алматы: Репроцентр-М; 2011, 234.
8. Найр Риту, Уилбур Дэвид. Цервикальная цитология по системе Бетесда. Терминология, критерии и пояснения. Перевод с англ. под ред. Н. Ю. Полонской. М.: Практическая медицина, 2017, 304 с.
9. Беляева Е. В., Рыбакова А. В., Гушин Я. А., Ваганова Д. С., Коптяева К. Е., Мужикян А. А. и др. Патоморфологическая диагностика легких при различных методах эвтаназии лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;3. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-03-05>
10. Шестакова В. Г., Козловская Ю. В., Нигматуллина Л. И. Молекулярные и субклеточные связывающие компоненты эндометрия в норме и при патологии. *Тверской медицинский журнал*. 2021;(2):90–101.
11. 4-Nitroquinoline N-oxide: Compound Summary. PubChem: NCBI, 2022. Доступно по: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5955>. Дата обращения: 12.08.2021.
12. Chen Y-F, Chang K-W, Yang I-T, Tu H-F, Lin S-C. Establishment of syngeneic murine model for oral cancer therapy. *Oral Oncol*. 2019 Aug;95:194–201. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.06.026>
13. Antal C, Teletin M, Wendling O, Dgheem M, Auwerx J, Mark M. Tissue collection for systematic phenotyping in the mouse. *Curr Protoc Mol Biol*. 2007;80(1):29A.4.1-29A.4.23. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb29a04s80>
14. Sekine J, Nakatani E, Hideshima K, Iwahashi T, Sasaki H. Diagnostic accuracy of oral cancer cytology in a pilot study. *Diagn Pathol*. 2017 Mar 16;12(1):27. <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0618-3>

References

1. Malignant neoplasms in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Ed. Kaprina AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO, 2019, 252 p. (In Russ.).
2. Hramtsov DA, Tail DV, Ryzhaev VA. Prevalence of malignant new forms of oral cavity structures. *Avicenna*. 2021;(78):37–38. (In Russ.).
3. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020 Mar;42(3):539–555. <https://doi.org/10.1002/hed.26006>
4. Malignant neoplasms of the oral cavity: clinical recommendations. Ministry of Health of the Russian Federation: official website. Available at: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/164>. Accessed: 12.08.2021. (In Russ.).
5. Ikonnikova AV, Juraeva ShF. Onconsistence of dentists: issues of primary diagnosis of cancer of the tongue. *Modern Dentistry*. 2019;(2(75)):46–48. (In Russ.).
6. Shulyak AV, Gusakovskiy SS, Grygorenko VN, Goydyk VS, Mytsik YO, Badiuk NS. Modern aspects of the use of Dimethyl sulfoxide (DMSO). *PharmacologyOnline*. 2021;1:82–89.
7. Shapiro NA, Shebanova AI, Eleubaeva ZhB. Cytological diagnostics of diseases of the esophagus, stomach and intestines: color atlas. Moscow, Almaty: Reprocenter-M; 2011, 234. (In Russ.).
8. Nayar Ritu, Wilbur David. Cervical cytology according to the Bethesda system. Terminology, criteria and explanations. Translated from English. edited by N. Yu. Polonskaya. Moscow: Practical Medicine, 2017, 304 p. (In Russ.).
9. Belyaeva EV, Rybakova AV, Gushchin YaA, Vaganova DS, Koptyaeva KE, Muzhikyan AA, et al. Pathomorphological diagnostics of lungs at various methods of euthanasia of laboratory animals. *Laboratory Animals for Science*. 2018;3. (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-03-05>
10. Shestakova VG, Kozlovskaya YuV, Nigmatullina LI. Molecular and subcellular binding components endometry in normal and in pathology. *Tver Medical Journal*. 2021;(2):90–101. (In Russ.).
11. 4-Nitroquinoline N-oxide: Compound Summary. PubChem: NCBI, 2022. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5955>. Accessed: 12.08.2021.
12. Chen Y-F, Chang K-W, Yang I-T, Tu H-F, Lin S-C. Establishment of syngeneic murine model for oral cancer therapy. *Oral Oncol*. 2019 Aug;95:194–201. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.06.026>
13. Antal C, Teletin M, Wendling O, Dgheem M, Auwerx J, Mark M. Tissue collection for systematic phenotyping in the mouse. *Curr Protoc Mol Biol*. 2007;80(1):29A.4.1-29A.4.23. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb29a04s80>
14. Sekine J, Nakatani E, Hideshima K, Iwahashi T, Sasaki H. Diagnostic accuracy of oral cancer cytology in a pilot study. *Diagn Pathol*. 2017 Mar 16;12(1):27. <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0618-3>

Информация об авторах:

Шестакова Валерия Геннадьевна – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8097-4427>, SPIN: 4541-8220, AuthorID: 480836

Нигматуллина Лейла Ильдаровна – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация; врач-генетик лаборатории ОО «Медикал Геномикс», г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1598-9638>, SPIN: 8215-5551, AuthorID: 1125603

Атаджанов Ильяс Борисович – студент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

Донсков Сергей Александрович – доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>, SPIN: 1026-7460, AuthorID: 192967

Козловская Юлия Владимировна – к.б.н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8036-8790>, SPIN: 9338-9631, AuthorID: 511371

Долгоплов Игорь Станиславович – д.м.н., заведующий кафедрой педиатрии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. SPIN: 4312-9786, AuthorID: 129840

Рыков Максим Юрьевич – д.м.н., доцент, проректор по научной работе и инновационной деятельности, заведующий кафедрой онкологии факультета дополнительного профессионального образования, директор Института персонализированной онкологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8398-7001>, SPIN: 7652-0122, AuthorID: 724128, ResearcherID: R-9768-2016, Scopus Authors ID: 57190262153

Information about authors:

Valeria G. Shestakova – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8097-4427>, SPIN: 4541-8220, AuthorID: 480836

Leila I. Nigmatullina – Postgraduate student of the Department of Histology, Embryology and Cytology Tver State Medical University, Ministry of Health of Russia; geneticist of the laboratory Medical Genomics, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1598-9638>, SPIN: 8215-5551, AuthorID: 1125603

Ilyas B. Atadzhanov – Student of the Department of Histology, Embryology and Cytology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

Sergei A. Donskov – Associate Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>, SPIN: 1026-7460, AuthorID: 192967

Yulia V. Kozlovskaya – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8036-8790>, SPIN: 9338-9631, AuthorID: 511371

Igor S. Dolgoplov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Pediatrics, Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. SPIN: 4312-9786, AuthorID: 129840

Maksim Yu. Rykov [✉] – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Vice-Rector for Research and Innovation, Head of the Oncology Department of the Faculty of Additional Professional Education, Director of the Institute of Personalized Oncology Tver State Medical University, Tver, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8398-7001>, SPIN: 7652-0122, AuthorID: 724128, ResearcherID: R-9768-2016, Scopus Authors ID: 57190262153

Вклад авторов:

Шестакова В. Г. – написание текста, разработка концепции научной работы, статистическая обработка, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания;

Нигматуллина Л. И. – написание текста, планирование и анализ научной работы, разработка концепции научной работы, сбор данных, статистическая обработка, составление черновика рукописи;

Атаджанов И. Б. – написание текста, планирование и анализ научной работы, статистическая обработка, составление черновика рукописи;

Донсков С. А. – написание текста, сбор и анализ данных, статистическая обработка;

Козловская Ю. В. – написание текста, сбор и анализ данных, составление черновика рукописи;

Долгополов И. С. – написание текста, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания;

Рыков М. Ю. – написание текста, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, окончательное утверждение публикуемой версии рукописи.

Authors contribution:

Shetakova V. G. – writing the text, developing the concept for scientific work, statistical processing, critical revision with the introduction of valuable intellectual content;

Nigmatullina L. I. – writing the text, planning and analyzing scientific work, developing the concept of scientific work, collecting data, statistical processing, drafting the manuscript;

Atadzhanov I. B. – text writing, planning and analysis of scientific work, statistical processing, drafting the manuscript;

Donskov S. A. – text writing, data collection and analysis, statistical processing;

Kozlovskaya Yu. V. – writing text, collecting and analyzing data, drafting a manuscript;

Dolgoplov I. S. – text writing, analysis of scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, final approval of the published version of the manuscript;

Rykov M. Yu. – text writing, analysis of scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, final approval of the published version of the manuscript.