

Обнаружение грибов в ладонном апоневрозе при контрактуре Дюпюитрена методом сканирующей электронной микроскопии

Т.А. Ступина, Н.С. Мигалкин, Н.А. Щудло, М.М. Щудло

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия

Реферат

Цель исследования — определить возможности световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в обнаружении грибов в операционном материале от пациентов с контрактурой Дюпюитрена. **Материал и методы.** Исследовали фрагменты ладонного апоневроза от 27 пациентов с контрактурой Дюпюитрена. Для исследования в СЭМ JSM-840 (Jeol, Япония) образцы после фиксации обезвоживали, пропитывали в камфене, высушивали, напыляли серебром в ионном напылителе IB-6 (Eiko, Япония). Парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином и метенамин-серебром P.A.S.M. оцифровывали с помощью микроскопа AxioScope.A1 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Германия). **Результаты.** При окрашивании парафиновых срезов метенамин-серебром P.A.S.M. признаки микотической микрофлоры выявлены только у двух (7,4%) из 27 пациентов, а с применением метода СЭМ — у 16 пациентов (59%). Морфологические фенотипы и ультраструктура межклеточных контактов дрожжеподобных грибов сходны с *Candida albicans*. Во всех случаях обнаружены почкующиеся клетки. Деструкция соединительной ткани ладонного апоневроза проявлялась в виде разрыхления, расслоения и формирования полостей — зон лизиса. **Заключение.** Метод СЭМ позволил оценить ультраструктуру клеток грибов и их взаимодействие с окружающими тканями в операционном материале от пациентов с контрактурой Дюпюитрена. Более высокий процент выявления грибковой инвазии по сравнению с методом P.A.S.M. связан с более высокой разрешающей способностью и возможностью анализа большей площади тканевых образцов.

Ключевые слова: контрактура Дюпюитрена, сканирующая электронная микроскопия, микозы.

doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-147-152

Detection of Fungi in the Palmar Aponeurosis in Patients with Dupuytren's Contracture by Scanning Electron Microscopy

T.A. Stupina, N.S. Migalkin, N.A. Shchudlo, M.M. Shchudlo

Iizarov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation

Abstract

The purpose of the study was to determine the capabilities of scanning electron and light microscopy in detecting fungi in surgical material from the patients with Dupuytren's contracture. **Material and Methods.** The fragments of palmar aponeurosis from 27 patients with Dupuytren's contracture were examined. Paraffin sections stained with hematoxylin-eosin and Periodic Schiff-Methenamine Silver were digitized using AxioScope.A1 microscope (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Germany). For examination in JSM-840 scanning electron microscope (Jeol, Japan), the samples were dehydrated after fixation, soaked in camphene, dried, and silver sprayed in the IB-6 ionizer (Eiko,

Ступина Т.А., Мигалкин Н.С., Щудло Н.А., Щудло М.М. Обнаружение грибов в ладонном апоневрозе при контрактуре Дюпюитрена методом сканирующей электронной микроскопии. Травматология и ортопедия России. 2020;26(1):147-152. doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-147-152.

Cite as: Stupina T.A., Migalkin N.S., Shchudlo N.A., Shchudlo M.M. [Detection of Fungi in the Palmar Aponeurosis in Patients with Dupuytren's Contracture by Scanning Electron Microscopy]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2020;26(1):147-152. doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-147-152. (In Russian).

Ступина Татьяна Анатольевна / Tatiana A. Stupina; e-mail: StupinaSTA@mail.ru

Рукопись поступила/Received: 01.02.2019. Принята в печать/Accepted for publication: 20.05.2019.

Japan). **Results.** In paraffin sections stained with methenamine-silver, the signs of mycotic microbiota were detected only in 2 (7.4%) of 27 patients, and with the use scanning electron microscopy — in 16 patients (59%). The morphological phenotypes and ultrastructure of intercellular contacts of yeast-like fungi were similar to *Candida albicans*. In all cases, the budding cells were detected. The destruction of the connective tissue of the palmar aponeurosis was observed in the form of loosening, stratification, and cavities formation (the zones of lysis). **Conclusion.** The scanning electron microscopy allowed to evaluate the ultrastructure of fungal cells and their interaction with surrounding tissues in the surgical material from the patients with Dupuytren's contracture. A higher percentage of detection of fungal invasion compared to the Periodic Schiff-Methenamine staining was associated with a higher resolution and the ability of a larger area of tissue samples analysis.

Keywords. Dupuytren's contracture, scanning electron microscopy, mycoses.

Введение

Контрактура Дюпюитрена (ладонный фасциальный фиброматоз) — фибропролиферативное заболевание, характеризующееся повышенным содержанием миофибробластов в соединительной ткани ладонного апоневроза, гиперпродукцией коллагена III и I типов, формированием патологических хорд [1], что приводит к ограничению разгибания пальцев кисти, а затем к развитию прогрессирующей сгибательной контрактуры. Предполагается, что это заболевание не имеет инфекционной природы, однако в литературе встречаются единичные описания клинических случаев флегмонозно-абсцедирующей инфекции в начальной стадии фиброматоза [2] и упоминания о развитии микозов кожи при продвинутой контрактуре [3].

К методам лабораторной диагностики микозов относятся световая микроскопия, люминесцентный анализ, иммуногистохимия, выделение чистой культуры посевом на специальные питательные среды и идентификация возбудителя [4]. Гистопатологическое исследование является важным диагностическим инструментом, однако морфологические характеристики грибов в очень редких случаях являются специфическими, поэтому гистопатологическое заключение включает описание гриба, указание на наличие или отсутствие тканевой инвазии и реакции тканей на инфекцию.

В последние годы в практике клинко-микробиологических исследований все чаще применяется сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [5, 6, 7, 8], которая позволяет изучить поверхность клеток грибов с высоким разрешением, а также визуализировать взаимодействие грибов с тканевыми структурами [7]. При подозрениях на микозы и даже при выраженных клинических проявлениях микробиологический метод посева нередко дает ложно-отрицательные результаты, а PCR и иммуногистохимический анализ доступны далеко не во всех лабораториях, поэтому СЭМ рассматривается и как диагностический метод [9], позволяющий различить бактериальные, грибковые и паразитарные поражения [10].

Исследования патоморфологии ладонного апоневроза при контрактуре Дюпюитрена методом СЭМ немногочисленны [11, 12, 13]. Сведений о выявлении микотической инфекции в ладонном апоневрозе пациентов с контрактурой Дюпюитрена методом СЭМ, а также другими лабораторными методами в доступной литературе нет. Поскольку распознавание и лечение микозов важно для обеспечения полноценной реабилитации, повышения качества и продолжительности жизни пациентов, оценка микотического поражения ладонного апоневроза пациентов с контрактурой Дюпюитрена представляется актуальной задачей.

Цель исследования — определить возможности световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в обнаружении грибов в операционном материале от пациентов с контрактурой Дюпюитрена.

Материал и методы

Исследовали образцы тканей — предсуживильные хорды патологически измененного ладонного апоневроза от 27 пациентов (24 мужчины и 3 женщины) в возрасте 39–77 лет (средний возраст $60,44 \pm 1,98$) с контрактурой Дюпюитрена. У одного пациента была контрактура Дюпюитрена I степени по R. Tubiana [14], у трех пациентов — II степени, у 19 пациентов — III степени, у четырех пациентов IV степени. Давность заболевания составила от 1 до 30 лет (в среднем $7,69 \pm 1,32$).

Исследование операционного материала выполнено двумя методами.

Подготовка к исследованию в сканирующем электронном микроскопе заключалась в следующем: тканевые образцы размером 3×5 мм после фиксации в формалине промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах с восходящей концентрацией от 70 до 96%, затем пропитывали в камфене по оригинальной методике (патент РФ № 2008150910/12) и высушивали в термостате при 37°C . Затем осуществляли монтаж объектов с помощью токопроводящего клея на хорошо отполированные чистые алюминиевые диски, напыляли серебром в ионном напылителе

IV-6 (Eiko, Япония). Посредством проводящей пасты обеспечивали отведение заряда с напыленной поверхности образца. Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (Jeol, Япония).

Световая микроскопия. Для патогистологического исследования тканевые образцы фиксировали в формалине, по стандартной методике заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм изготовлены на микротоме Reichert (Австрия) и окрашены гематоксилином и эозином и метенамин-серебром P.A.S.M. (для выявления мицелия грибов). Цифровые изображения фрагментов парафиновых срезов получены с помощью микроскопа AxioScope.A1 с цифровой камерой AxioCam и программного обеспечения Zenblue (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Германия).

Результаты

Методом СЭМ у 16 пациентов из 27 обнаружено присутствие дрожжеподобных грибов (рис. 1). Из них у одного пациента было заболевание I степени давностью менее года; у двух пациентов имелась контрактура II степени, давность фиброматоза — 1,5 года и 30 лет; у 10 пациентов контрактура III степени, длительность заболевания от пяти до 20 лет; у трех пациентов — контрак-

тура IV степени, длительность заболевания — 8, 11 и 20 лет. У 14 пациентов была выявлена дрожжевая форма грибов (рис. 1 a, b, c), и еще у двух пациентов — бластоспоры (рис. 1 d). Дрожжевые клетки имели округлую или округло-овальную, грушевидную форму, скрепленные в кластеры, почкование в нескольких направлениях в виде мутовок, кустиков (рис. 1 a, b). Встречались тонкие дрожжевые клетки вытянутой цилиндрической формы: как отдельно лежащие, так и скрепленные в кластеры (рис. 1 c). Размеры клеток варьировали от 2 до 7 мкм. У части клеток отмечена ярко контрастированная область в центре, ее диаметр составлял около 25–30% от диаметра клетки. Области межклеточных контактов толщиной менее 0,5 мкм. Как при сохранных, так и при разрушенных контактах был различим кольцевидный поясик на одном конце клетки и почка на другом. Бластоспоры имели шарообразную форму диаметром около 1 мкм и располагались в виде гроздеподобных скоплений (рис. 1 d). Деструкция соединительной ткани ладонного апоневроза проявлялась в виде разрыхления, расслоения и формирования полостей — зон лизиса.

При световой микроскопии парафиновых срезов у двух пациентов из 27 были выявлены участки скопления псевдомицелиярных структур микотической микрофлоры (рис. 2).

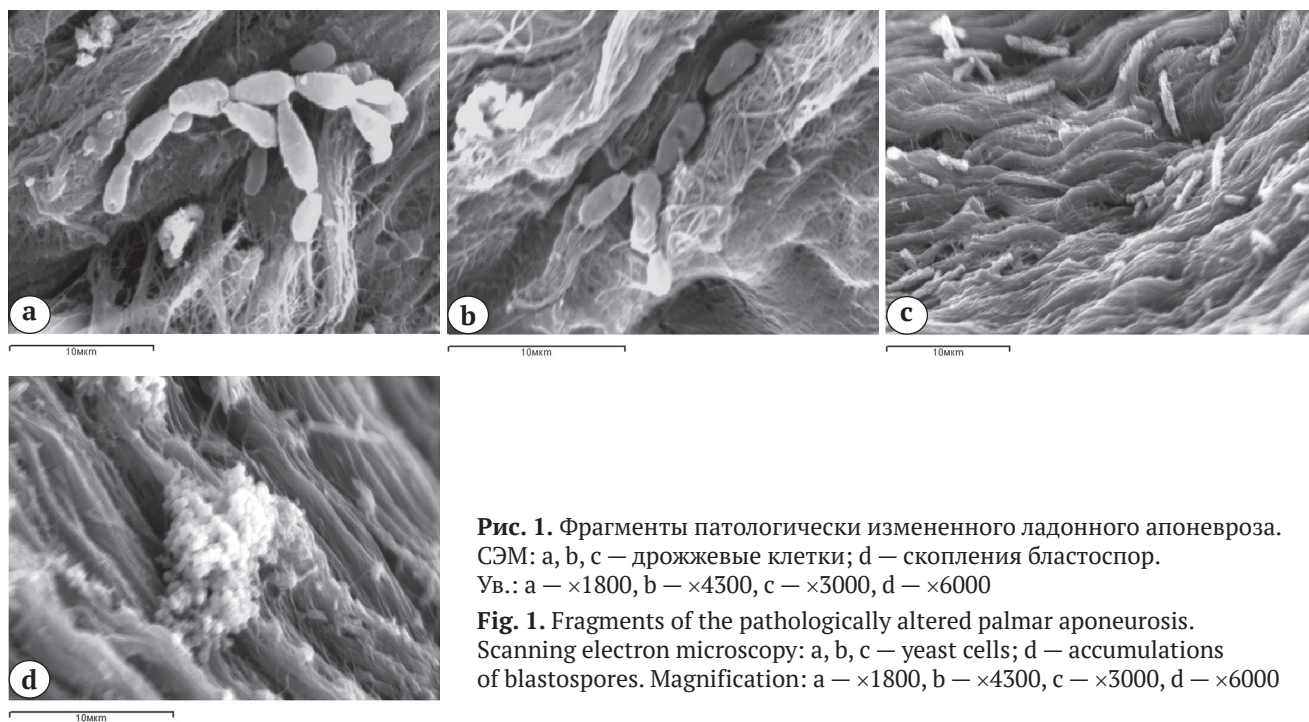


Рис. 1. Фрагменты патологически измененного ладонного апоневроза. СЭМ: a, b, c — дрожжевые клетки; d — скопления бластоспор. Ув.: a — $\times 1800$, b — $\times 4300$, c — $\times 3000$, d — $\times 6000$

Fig. 1. Fragments of the pathologically altered palmar aponeurosis. Scanning electron microscopy: a, b, c — yeast cells; d — accumulations of blastospores. Magnification: a — $\times 1800$, b — $\times 4300$, c — $\times 3000$, d — $\times 6000$

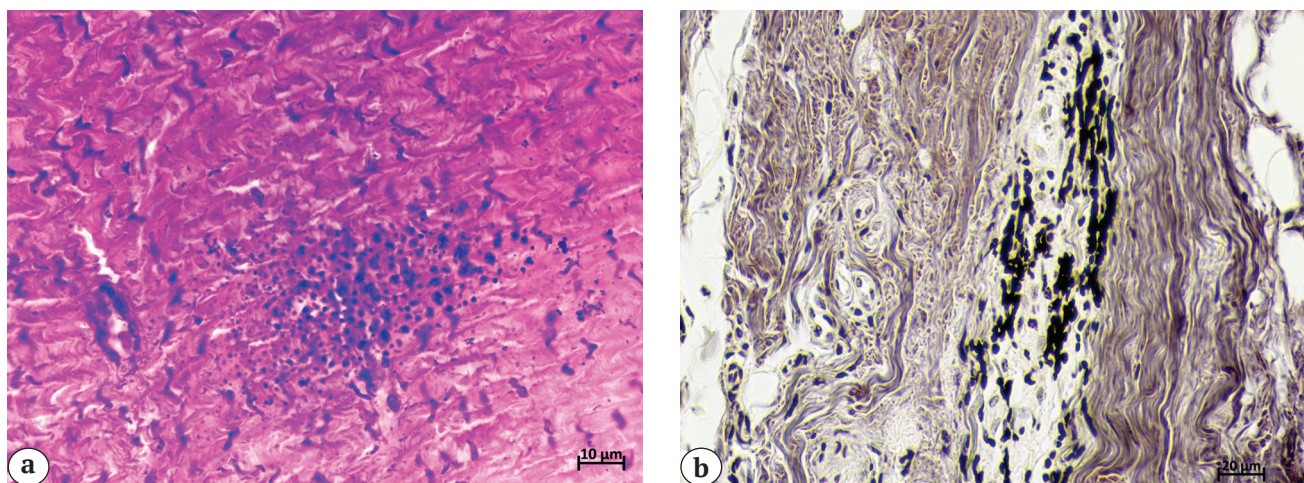


Рис. 2. Фрагмент тяжа ладонного апоневроза при контрактуре Дюпюитрена с признаками грибковой инвазии: а — парафиновый срез, окраска гематоксилином и эозином; б — окраска метенамин-серебром P.A.S.M., грибы окрашены черным цветом. Ув.: а — $\times 600$, б — $\times 400$

Fig. 2. A fragment of the palmar aponeurosis strand in Dupuytren's contracture with signs of fungal invasion: а — the paraffin section stained with hematoxylin and eosin; б — Periodic Schiff-Methenamine silver, the fungi are stained black. Magnification: а — $\times 600$, б — $\times 400$

Обсуждение

При гистологическом исследовании, вследствие малого объема биоптата, обнаружение грибов не всегда возможно, особенно при их низких концентрациях в тканях и в связи с очаговостью микотического процесса. Неудивительно, что при светооптическом исследовании признаки микотической микрофлоры выявлены только у двух (7,4%) из 27 пациентов, а с применением метода СЭМ — у 16 (59%) пациентов. Преимуществом СЭМ является возможность анализа большой площади тканевого образца (в нашем исследовании до 15 мм²), а также гораздо более высокая разрешающая способность [15].

Выявленная грибковая инвазия ладонного апоневроза при контрактуре Дюпюитрена является патогенной, так как обнаружены почкующиеся клетки. Известно, что почкующиеся клетки — инфекционная форма гриба, а псевдомицелий — форма, в которой гриб существует в тканях [16]. По морфологии выявленные дрожжеподобные грибы сходны с грибами рода *Candida*, которые имеют вытянутую цилиндрическую или овальную грушевидную форму и в определенных условиях способны образовывать примитивный мицелий. Дрожжеподобным грибам рода *Candida* свойственно явление диморфизма: они могут встречаться как в виде бластоспор, так и в виде коротких и длинных нитей [17].

Ограничение выполненного исследования — отсутствие данных иммуногистохимического анализа, PCR и иммуногибридизации, однако грибки были выявлены двумя методами, один из которых

(СЭМ) позволяет с высокой вероятностью судить об их таксономической принадлежности — характерная форма межклеточных контактов рассматривается как специфический ультраструктурный признак *Candida albicans*, несмотря на выраженный плеоморфизм этого вида [18].

Наиболее очевидными факторами, предрасполагающими к кандидозной инфекции у больных с контрактурой Дюпюитрена, являются затруднение гигиены складок кожи при стойкой деформации кисти, пожилой возраст и коморбидный статус. Однако, как показало выполненное нами пилотное исследование, развитие микотической инфекции ладонного апоневроза встречалось при первой степени заболевания (в отсутствие контрактуры), а также у пациентов молодого возраста, не имеющих сопутствующих заболеваний.

Грибковое поражение апоневроза может быть следствием нарушений барьерных свойств кожи при развитии дермального фиброматоза [19], а также расстройств ее кровоснабжения и иннервации [20, 21]. Нарушения иммунной реактивности и антиоксидантного статуса при болезни Дюпюитрена следует рассматривать в качестве системных предрасполагающих факторов грибковых инфекций [22].

Необходимы комплексные дополнительные исследования для всесторонней оценки клинического значения оппортунистической инвазивной грибковой инфекции [23] при контрактуре Дюпюитрена с учетом того, что эти пациенты характеризуются более ранней смертностью [24].

Метод сканирующей электронной микроскопии позволяет визуализировать и оценивать морфологию клеток грибов, их форму, размеры, взаиморасположение и может быть применен в диагностических технологиях клинической микробиологии. Выполненное исследование позволяет сделать вывод о высокой частоте микотического поражения ладонного апоневроза у пациентов с контрактурой Дюпюитрена, что необходимо учитывать в протоколах обследования и лечения.

Этика публикации

Все пациенты дали письменное информированное согласие на проведение исследований. Исследование одобрено этическим комитетом учреждения (протокол № 2 (57) от 19.03.2018) и проводилось в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Хельсинкской декларации 1975 г., пересмотренными в 2013 г.

Работа поддержана программой МЗ РФ в рамках государственного задания ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» для выполнения НИР на 2018–2020 гг.

Конфликт интересов: не заявлен.

Источник финансирования: государственное бюджетное финансирование.

Вклад авторов

Ступина Т.А. — разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследований методом сканирующей электронной микроскопии, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование.

Мигалкин Н.С. — проведение патогистологических исследований, анализ полученных данных, подготовка текста.

Щудло Н.А. — разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста.

Щудло М.М. — разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста.

Литература [References]

- Ng M., Thakkar D., Southam L., Werker P., Ophoff R., Becker K., Nothnagel M. et al. A Genome-wide Association Study of Dupuytren Disease Reveals 17 Additional Variants Implicated in Fibrosis. *Am J Hum Genet.* 2017;101(3):417-427. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.08.006.
- Unglaub F., Loos B., Schwarz S., Kneser U., Dragu A., Horch R.E. Phlegmonous-infection in first degree Dupuytren's disease. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129(4):445-448. doi: 10.1007/s00402-008-0589-7.
- Dumitrescu-Ionescu D. A New Therapeutic Approach to Dupuytren's Contracture / Disease (DD). *Adv Plast Reconstr Surg.* 2017;1(5):129-136.
- Guarner J., Brandt M.E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):247-280. doi: 10.1128/CMR.00053-10.
- Ensikat H.-J., Weigend M. Creating internal conductivity in dry biological SEM samples by a simple vapour treatment. *J Microsc.* 2014;256(3):226-230. doi: 10.1111/jmi.12177.
- Sugimoto S., Okuda K., Miyakawa R., Sato M., Arita-Morioka K., Chiba A. et al. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Sci Rep.* 2016;6:25889. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep25889>. doi: 10.1038/srep25889.
- Chebatar I.V., Novikov I.A., Subbot A.M., Mayansky N.A. Lanthanoid staining as a fast technology of preparing microbiological specimens for scanning electron microscopy. *CTM.* 2017;9(3):23-29. doi: 10.17691/stm2017.9.3.03.
- Raab N., Bachelet I. Resolving biofilm topography by native scanning electron microscopy. *J Biol Methods.* 2017;4(2):e70. doi: 10.14440/jbm.2017.175.
- Yue X., Wang A., Li Q. The Role of Scanning Electron Microscopy in the Direct Diagnosis of Onychomycosis. *Scanning.* 2018:1581495. doi: 10.1155/2018/1581495.
- Yuping R., Kaiwen Z., Wenying H., Jinghong H., Xiaowei F., Shuang C. et al. Observation of Fungi, Bacteria, and Parasites in Clinical Skin Samples Using Scanning Electron Microscopy. In: *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences.* 2016. Available from: <https://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/observation-of-fungi-bacteria-and-parasites-in-clinical-skin-samples-using-scanning-electron-microsc>. doi: 10.5772/61850.
- Legge J.W., Finlay J.B., McFarlane R.M. A study of Dupuytren's tissue with the scanning electron microscope. *J Hand Surg Am.* 1981;6(5):482-492. doi: 10.1016/s0363-5023(81)80109-8.
- Józsa L., Salamon A., Réffy A., Renner A., Demel S., Donhöffer A., Pintér T., Thöring J. Fine structural alterations of the palmar aponeurosis in Dupuytren's contracture. A combined scanning and transmission electronmicroscopic examination. *Zentralbl Allg Pathol.* 1988;134(1):15-25.
- Щудло Н.А., Ступина Т.А., Щудло М.М. Сканирующая электронная микроскопия ладонного апоневроза при контрактуре Дюпюитрена продвинутой стадии. *Травматология и ортопедия России.* 2019;(25)2: 150-156. doi: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-150-156.
- Shchudlo N.A., Stupina T.A., Shchudlo M.M. [Scanning Electron Microscopy of Palmar Fascia in Dupuytren's Disease of Advanced Stage]. *Травматология и ортопедия России* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2019;25(2):150-156. doi: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-150-156. (In Russian).
- Tubiana R. Dupuytren's disease of the radial side of the hand. *Hand Clin.* 1999;15(1):149-159.
- Scherer W.P., Scherer M.D. Scanning electron microscope imaging of onychomycosis. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2004;94(4):356-362. doi: 10.7547/0940356.
- Kubota T. Chronic and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Anippon Isbink Gakkai Zassibi.* 1998;(39)4: 213-218. doi: 10.3314/jjmm.39.213.
- Хмельницкий О.К., Быков В.Л., Хмельницкая Н.М. Патоморфологическая диагностика микозов, вызываемых условно-патогенными грибами. Режим доступа: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/labora15.htm>
- Hmel'nickij O.K., Bykov V.L., Hmel'nickaya N.M. [Pathomorphological diagnosis of Pathomorphological

- diagnosis of mycosis caused by opportunistic fungi]. Available from: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/labora15.htm> (In Russian).
18. Staniszewska M., Bondaryk M., Swoboda-Kopec E., Siennicka K., Sygitowicz G., Kurzatkowski W. Candida albicans morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):813-821. doi: 10.1590/S1517-83822013005000056.
 19. Wade R., Igalı L., Figus A. Skin involvement in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Eur.* 2016;41(6):600-608. doi: 10.1177/1753193415601353.
 20. Щудло Н.А., Костин В.В. Патогенез нейропатии при контрактуре Дюпюитрена. *Гений ортопедии.* 2019;25(1):58-64. doi: 10.18019/1028-4427-2019-25-1-58-64.
 21. Долганова Т.И., Щудло Н.А., Шабалин Д.А., Костин В.В. Оценка гемодинамики артерий кисти и микроциркуляции кожи при контрактуре Дюпюитрена 3-4 стадий до и после оперативного лечения с применением чрескостной фиксации по Г.А. Илизарову. *Гений ортопедии.* 2019;25(1):86-92. doi: 10.18019/1028-4427-2019-25-1-86-92.
 22. Dolganova T.I., Shchudlo N.A., Shabalin D.A., Kostin V.V. [Assessment of hemodynamics of the hand arteries and skin microcirculation in Dupuytren's contracture stages 3 to 4 of before and after surgical treatment with the use of Ilizarov transosseous fixation]. *Genij ortopedii* 2019;25(1):86-92. doi: 10.18019/1028-4427-2019-25-1-86-92. (In Russian).
 23. Rehman S., Goodacre R., Day P.J., Bayat A., Westerhoff H.V. Dupuytren's: a systems biology disease. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):238. doi: 10.1186/ar3438.
 24. Badiie P., Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014;139(2):195-204.
 25. Gudmundsson K.G., Arngrı́msson R., Sigfússon N., Jónsson T. Increased total mortality and cancer mortality in men with Dupuytren's disease: a 15-year follow-up study. *J Clin Epidemiol.* 2002;55(1):5-10. doi: 10.1016/s0895-4356(01)00413-9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ступина Татьяна Анатольевна — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган

Мигалкин Николай Сергеевич — научный сотрудник лаборатории морфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган

Щудло Наталья Анатольевна — д-р мед. наук, заведующая лабораторией клиники реконструктивно-пластической хирургии и хирургии кисти, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган

Щудло Михаил Моисеевич — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клиники реконструктивно-пластической хирургии и хирургии кисти, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган

AUTHORS' INFORMATION:

Tatiana A. Stupina — Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Morphology, Ilizarov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation

Nikolai S. Migalkin — Researcher, Laboratory of Morphology, Ilizarov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation

Natalia A. Shchudlo — Dr. Sci. (Med.), Head, Clinical and Experimental Laboratory of Reconstructive-Plastic Microsurgery and Hand Surgery, Ilizarov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation

Mikhail M. Shchudlo — Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory Clinical and Experimental Laboratory of Reconstructive and Plastic Microsurgery and Hand Surgery, Ilizarov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation