

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Том 11 | № 2 | 2022

ISSN 2226-5988 (print)

ISSN 2686-6749 (online)

**«Клиническая  
и экспериментальная  
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность: 4 раза в год

Основан в 2011 году

Журнал индексируется в:

Scopus;

RSCI;

РИНЦ;

представлен в информационной  
базе данных eLIBRARY.ru

Включен в перечень ВАК

**Учредитель**

ФГБНУ «РНЦХ

им. акад. Б.В. Петровского»

119435, г. Москва,

Абрикосовский пер., д. 2

**Адрес редакции**

117418, Москва,

ул. Цюрупы, д. 3

Заведующая редакцией

Куликова К.А.

Научный редактор

Васюкова О.А.

**Телефоны** +7 (499) 120-13-34

+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

www.mdv-group.ru

**Подписные индексы:**

**70045** по каталогу  
агентства «Урал-Пресс»

**70045** по каталогу «Пресса  
России» через агентство АРЗИ

Свидетельство о регистрации  
средства массовой информации  
ПИ № ФС77-47183  
от 2 ноября 2011 года.

© НИИ морфологии человека  
им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ РНЦХ  
им. акад. Б.В. Петровского

## Главный редактор

*Михалева Л.М.*, член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор

## Почетный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

## Ответственные секретари

*Болтовская М.Н.*, доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия

*Кондашевская М.В.*, доктор биол. наук, доцент, Москва, Россия,

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

## Редакционная коллегия

*Александрова М.А.*, доктор биол. наук,  
Москва, Россия

*Алексеева Н.Т.*, доктор мед. наук,  
профессор, Воронеж, Россия

*Андреева Е.Р.*, доктор биол. наук, доцент,  
Москва, Россия

*Банин В.В.*, член-корр. РАН, доктор  
мед. наук, профессор, Москва, Россия

*Большакова Г.Б.*, доктор биол. наук,  
Москва, Россия

*Буравков С.В.*, доктор мед. наук,  
Москва, Россия

*Гарновская М.Н.*, кандидат биол. наук,  
доцент, Чарльстон, США

*Ковригина А.М.*, доктор биол. наук,  
профессор, Москва, Россия

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

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

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

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

*Никитюк Д.Б.*, академик РАН,  
доктор мед. наук, профессор,  
Москва, Россия

*Николенко В.Н.*, доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

## Редакционный совет

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

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

*Ермолаева С.А.*, доктор мед. наук,  
Москва, Россия

*Ерофеева Л.М.*, доктор биол. наук,  
профессор, Москва, Россия

*Знойко И.Ю.*, кандидат биол. наук,  
Чарльстон, США

*Кононов А.В.*, доктор мед. наук,  
профессор, Омск, Россия

*Кравцов В.Г.*, кандидат мед. наук,  
Тель-Авив, Израиль

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

# CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

Volume **11** | No **2** | 2022

ISSN 2226-5988 (print)

ISSN 2686-6749 (online)

“Clinical  
and Experimental  
Morphology”

SCIENTIFIC AND PRACTICAL  
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 4 issues per year

Founded in 2011

The journal is indexed in:  
Scopus;

Russian Science Citation Index  
(RSCI);  
online platform of the Russian  
Science Citation Index database  
eLIBRARY.ru

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

## Journal founder

FSBSI “Petrovsky National  
Research Centre of Surgery”

Abrikosovskiy lane, 2,  
Moscow, 119435, Russia

## Editorial office address

Tsyurupy st., 3,  
Moscow, 117418, Russia

Managing editor Kulikova K.A.  
Science editor Vasyukova O.A.

Tel. +7 (499) 120-13-34

+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

Edition of 500 copies

Publisher

“Gruppa MDV”

www.mdv-group.ru

## Subscription index:

**70045** according  
to the “Ural-Press” agency catalog

**70045** according to the “Pressa  
Rosii” catalog via ARZI agency

The mass media registration  
certificate III № ФС77-47183  
dated November 2, 2011

© Avtsyn research Institute  
of Human Morphology of FSBSI  
“Petrovsky National Research  
Centre of Surgery”

## Editor-in-chief

*Mikhaleva, Lyudmila M.*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,  
Dr. Sci. Med., Professor

## Honorary editor-in-chief

*Kakturskiy, Lev V.*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,  
Dr. Sci. Med., Professor

## Deputy editors-in-chief

*Zairatyants, Oleg V.*, Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

*Makarova, Olga V.*, Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

## Executive secretaries

*Boltovskaya, Marina N.*, Dr. Sci. Biol., Professor, Moscow, Russia

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

*Kondashevskaya, Marina V.*, Dr. Sci. Biol., Associate Professor, Moscow, Russia

## Editorial board

*Aleksandrova, Maria A.*, Dr. Sci. Biol.,  
Moscow, Russia

*Alekseeva, Natalia T.*, Dr. Sci. Med., Professor,  
Voronezh, Russia

*Andreeva, Elena R.*, Dr. Sci. Biol., Associate  
Professor, Moscow, Russia

*Banin, Victor V.*, Corresponding Member  
of the Russian Academy of Sciences,  
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

*Bolshakova, Galina B.*, Dr. Sci. Biol.,  
Moscow, Russia

*Buravkov, Sergey V.*, Dr. Sci. Med.,  
Moscow, Russia

*Chernyaev, Andrey L.*, Dr. Sci. Med.,  
Professor, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

*Nikityuk, Dmitriy B.*, Academician  
of the Russian Academy of Sciences,  
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

*Nikolenko, Vladimir N.*, Dr. Sci. Med.,  
Professor, Moscow, Russia

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

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

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

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

*Savel'yev, Sergey V.*, Dr. Sci. Biol., Professor,  
Moscow, Russia

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

## Editorial review board

*Chernikov, Valeriy P.*, Cand. Sci. Med.,  
Moscow, Russia

*Ermolaeva, Svetlana A.*, Dr. Sci. Med.,  
Moscow, Russia

*Erofeeva, Lyudmila M.*, Dr. Sci. Biol.,  
Professor, Moscow, Russia

*Fatkhudinov, Timur Kh.*, Dr. Sci. Med.,  
Associate Professor, Moscow, Russia

*Kononov, Alexey V.*, Dr. Sci. Med., Professor,  
Omsk, Russia

*Kravtsov, Vladimir G.*, Cand. Sci. Med.,  
Tel Aviv, Israel

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



На общем собрании Российской академии наук, проходившем 30 мая – 3 июня 2022 года, главный редактор журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» директор Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» доктор медицинских наук, профессор Людмила Михайловна Михалева избрана членом-корреспондентом Российской академии наук. Это признание научной общественностью больших заслуг Л.М. Михалевой в развитии фундаментальных исследований и прикладных разработок в области патологической анатомии.

Научная деятельность Людмилы Михайловны неразрывно связана с Институтом морфологии человека со времени ее поступления в клиническую ординатуру в 1985 году. После назначения директором в 2019 году она добилась высоких наукометрических показателей у всех лабораторий института, что значительно укрепило его престиж. Л.М. Михалева активно развивает направление клинической морфологии, создав школу молодых специалистов.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» поздравляют Людмилу Михайловну Михалеву с присвоением высокого научного звания, желают ей неиссякаемой энергии и новых творческих достижений!

Lyudmila M. Mikhaleva was elected as a corresponding member of the Russian Academy of Sciences at a meeting held from May 30 to June 3, 2022. Lyudmila M. Mikhaleva, Dr. Sci. Med., Professor, is the editor-in-chief of “Clinical and Experimental Morphology” and director of Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery.” The membership acknowledges her immense contribution to the development of fundamental and applied research in pathology.

In 1985, Lyudmila M. Mikhaleva became a clinical resident of Avtsyn Research Institute of Human Morphology. Since then, she has been involved in its scientific activities. Having become the director of the Institute, Lyudmila M. Mikhaleva contributed to high scientific results, thus boosting the prestige of the Institute and leading to the acknowledgement of its achievements. Lyudmila M. Mikhaleva also develops clinical morphology having founded a school of young researchers.

The editorial board of “Clinical and Experimental Morphology” congratulates Lyudmila M. Mikhaleva on becoming a corresponding member of the Russian Academy of Sciences and wishes her much enthusiasm and success!

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- С.С. Тодоров, А.С. Казьмин,  
В.Ю. Дерibas, С.С. Тодоров (мл.)  
Патологическая анатомия поражения сосудов  
легких при COVID-19
- 6 S.S. Todorov, A.S. Kazmin,  
V.Yu. Deribas, S.S. Todorov (Jr.)  
Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

- Е.П. Ульянова, Е.М. Непомнящая, Г.В. Жукова,  
А.Б. Сагакянц, Д.Ю. Якубова, О.Г. Шульгина  
ABC-транспортеры в формировании  
лекарственной устойчивости  
к платиносодержащим препаратам  
при серозной карциноме яичников
- 13 E.P. Ulianova, E.M. Nepomnyashchaya, G.V. Zhukova,  
A.B. Sagakyants, D.Yu. Yakubova, O.G. Shulgina  
ABC transporters in the development of platinum drug  
resistance in serous ovarian carcinoma
- К.А. Артемьева, Е.И. Гоуфман,  
И.И. Степанова, Н.Б. Тихонова,  
М.Н. Болтовская, Е.А. Пономаренко,  
И.М. Богданова, М.В. Мнихович, Л.М. Михалева  
Уровень протеолитических фрагментов IgG  
как дополнительный прогностический биомаркер  
рака предстательной железы
- 22 K.A. Artemyeva, E.I. Goufman,  
I.I. Stepanova, N.B. Tikhonova,  
M.N. Boltovskaya, E.A. Ponomarenko,  
I.M. Bogdanova, M.V. Mnikhovich, L.M. Mikhaleva  
The level of IgG proteolytic fragments as an additional  
prognostic biomarker of prostate cancer
- А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов,  
М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко  
Особенности накопления липидов в створках  
эпоксидобработанных ксеногенных биопротезов  
клапанов сердца
- 32 A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, L.A. Bogdanov,  
M.A. Rezvova, E.A. Ovcharenko  
Lipid accumulation features in the heart valve  
epoxy-treated xenograft
- Т.В. Палатова, А.Б. Бучарская, Е.С. Воронина,  
А.В. Медведева, С.С. Пахомий, О.С. Годяге,  
Г.Н. Маслякова  
Морфофункциональные изменения яичек плода  
человека при внутриутробной гипоксии
- 43 T.V. Palatova, A.B. Bucharskaya, E.S. Voronina,  
A.V. Medvedeva, S.S. Pahomy, O.S. Godage,  
G.N. Maslyakova  
Morphological and functional features in human fetal  
testicles during prenatal hypoxia

А.А. Епишкина, А.М. Авдалян, Е.В. Гребенкин,  
Д.С. Кобяков, Д.Н. Проценко, О.В. Зайратьянц  
Морфологическая оценка сосудистого  
микроокружения плоскоклеточных карцином  
легкого

54 A.A. Epishkina, A.M. Avdalyan, E.V. Grebenkin,  
D.S. Kobayakov, D.N. Protsenko, O.V. Zayratyants  
Morphological assessment of the vascular  
microenvironment of squamous cell carcinomas  
of lung

Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова, И.Ю. Коган  
Экспрессия PIBF в gravidарном эндометрии  
при репродуктивных потерях первого триместра  
после экстракорпорального оплодотворения

63 T.G. Tral, G.Kh. Tolibova, I.Yu. Kogan  
PIBF expression in the gravid endometrium  
in early pregnancy loss following assisted reproductive  
technologies

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

Ю.Г. Пархоменко, А.Л. Черняев, П.А. Ведяпин,  
Н.В. Мозгалева, Ж.Р. Омарова, О.А. Тишкевич,  
Е.А. Гомзикова, М.В. Самсонова, А.С. Жиленкова,  
Ю.С. Лебедин  
Изменения легких при сочетании ВИЧ-инфекции  
и COVID-19

71 Yu.G. Parkhomenko, A.L. Chernyaev, P.A. Vedyapin,  
N.V. Mozgaleva, Zh.R. Omarova, O.A. Tishkevich,  
E.A. Gomzikova, M.V. Samsonova, A.S. Zhilenkova,  
Yu.S. Lebedin  
Lung changes in a patient with combination of HIV  
infection and COVID-19

## Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19

*С.С. Тодоров, А.С. Казьмин, В.Ю. Дерibas, С.С. Тодоров (мл.)*

ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** Патологическая анатомия поражения сосудов легких является фундаментом понимания патогенеза и морфогенеза новой коронавирусной инфекции (COVID-19). В представленном обзоре акцент сделан на морфологических особенностях повреждения сосудов легких при COVID-19. Известно, что данный вирус способен вызывать не только цитопатическое действие с поражением клеток разных органов и тканей (альвеолоциты II типа, кардиомиоциты, нейроны, эпителиоциты желудочно-кишечного тракта), но и эндотелиотропное, что усугубляет развитие и течение острого альвеолярного повреждения легких. На основании данных литературы, изученных за период 2020–2022 годов, охарактеризованы микроскопические изменения стенок сосудов легких. Обсуждаются вопросы локального или системного поражения сосудов, динамика морфологических изменений в них, возможности развития микроангиопатии, васкулита, эндотелиита при COVID-19. Особое внимание уделено возможным механизмам развития эндотелиопатии при COVID-19, роли новой коронавирусной инфекции в генезе микротромбообразования. В перспективе патологоанатомическое исследование легких на материале аутопсий умерших при COVID-19 с применением гистологического, гистохимического, иммуногистохимического методов позволит уточнить особенности альтеративных, воспалительных изменений, репаративных процессов в стенках сосудов, неоангиогенеза в разные сроки развития заболевания.

**Ключевые слова:** патологическая анатомия, COVID-19, легкие, эндотелиопатия, эндотелиит, микротромбообразование

**Для корреспонденции:** Сергей Сергеевич Тодоров. E-mail: setodorov@yandex.ru

**Для цитирования:** Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерibas В.Ю., Тодоров С.С. (мл.). Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.

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

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

Статья поступила 29.07.2021. Получена после рецензирования 08.11.2021. Принята в печать 16.12.2021.

## Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19

*S.S. Todorov, A.S. Kazmin, V.Yu. Deribas, S.S. Todorov (Jr.)*

Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia

**Abstract.** Pathological anatomy of pulmonary vascular lesions plays a key role in understanding the pathogenesis and morphogenesis of COVID-19. This review focuses on morphological features of pulmonary vascular injury in COVID-19. The virus is known to be capable of causing not only cytopathic cell damage of various organs and tissues (type II pneumocytes, cardiomyocytes, neurons, epithelial cells of the gastrointestinal tract) but also endotheliotropic damage that aggravates the development and course of acute alveolar damage to the lungs. We studied the literature on microscopic changes in the vessel walls in lung tissue for 2020–2022. This review discusses the issues of local or systemic vascular lesions, morphological changes in the vessels over time, the likelihood of the development of microangiopathy, vasculitis, and endotheliitis in COVID-19 patients. Particular attention is paid to possible mechanisms of endotheliopathy in COVID-19 patients and its role in the microthrombi genesis. We speculate that in the future, postmortem lung examination in COVID-19 patients using histological, histochemical, and immunohistochemical methods will clarify the features of alterative and inflammatory changes and reparative processes in the blood vessel walls, as well as neoangiogenesis at different stages of the disease.

**Keywords:** pathological anatomy, COVID-19, lungs, endotheliopathy, endotheliitis, microthrombus formation

**Corresponding author:** Sergey S. Todorov. E-mail: setodorov@yandex.ru

**For citation:** Todorov S.S., Kazmin A.S., Deribas V.Yu., Todorov S.S. (Jr.). Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19. *Clin. exp. morphology*. 2022;11(2):6–12 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.

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

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

**Received** 29.07.2021. **Received in revised form** 08.11.2021. **Accepted** 16.12.2021.

## Введение

С момента появления первых случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) прошло больше двух лет [1–3]. Однако вопросы, связанные с возникновением вируса, наличием его тропности к клеточным элементам органов и тканей, развитием иммунологического ответа макроорганизма, до сих пор остаются дискуссионными. Кроме того, данные литературы дают основание полагать, что инфекция, вызванная SARS-CoV-2, сопровождается высоким риском летального исхода по сравнению с заболеваниями, ассоциированными с вирусом гриппа и SARS-CoV-1 [1, 4–6].

В настоящее время известно, что SARS-CoV-2 представляет собой новый бета-коронавирус, который относится к группе вирусов с одноцепочечной РНК с белковым шипом – S-белком [7, 8].

Попадание вируса в организм воздушно-капельным путем вызывает поражение нижних дыхательных путей и легких, что приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [9–11].

Установлено, что вирус SARS-CoV-2 с помощью S-белка способен проникать в клетки разных органов (альвеолоциты II типа, кардиомиоциты, нейроны, эпителиоциты желудочно-кишечного тракта) посредством рецептора ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа – АПФ2. Данный рецептор является одним из ключевых компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, которая играет важную роль в контроле уровня артериального давления и регуляции водно-электролитного баланса. В дальнейшем благодаря участию трансмембранного белка серина-2 (transmembrane protease, serine 2, TMPRSS2) ускоряется процесс внедрения вируса в альвеолярные эпителиальные клетки легких, содержащие большое количество данных рецепторов [7, 12–14].

После попадания вируса в клетку-хозяина происходит его репликация, образуются везикулы, которые проникают в клеточную мембрану и потом в секрет дыхательных путей. Это, в свою очередь, вызывает активацию макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов с активной секрецией цитокинов, что приводит к развитию цитокинового шторма с участием IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, каспазы 1 [15–17].

С другой стороны, вирус обладает эндотелиотропностью и может вызывать повреждение эндотелиоцитов кровеносных сосудов разных органов [18–20]. Однако тонкие механизмы воздействия вируса на клетки эндотелия сосудов легких, морфологические особенности их поражения в разные сроки заболевания до сих пор остаются малоизученными.

Цель работы – собрать и систематизировать накопленную за 2020–2022 годы информацию, касающуюся патологической анатомии поражения сосудов легких при COVID-19 с учетом морфологических и иммуногистохимических результатов исследования.

В рамках этого исследования проведен поиск источников литературы в базе данных PubMed по ключевым словам: COVID-19, endotheliopathy, endotheliitis, microangiopathy, morphology, immunohistochemistry, lung с выбором типов статей Clinical Trial, Case Report, Review, Systemic Review. Отбор статей проводился с учетом их информативности относительно темы настоящей работы, международного научного рейтинга журнала. После скрининга 95 источников литературы отобраны и проанализированы 52 наиболее актуальные статьи, доступные в полнотекстовом формате, которые вошли в данный обзор.

## Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19

В патологоанатомическом исследовании, основанном на анализе 12 аутопсий, описаны особенности поражений сосудов легких при COVID-19 [21]. При макроскопическом исследовании легкие были резко увеличены в размерах, полнокровные, отечные. В единичных случаях в сосудах легких имелись тромбы темно-красного цвета, геморрагические инфаркты. При гистологическом исследовании легких при COVID-19 отмечались резкое полнокровие капилляров альвеолярных перегородок и их разрывы. Кровеносные сосуды легких были дилатированы, в отдельных из них содержались тромбы. Авторы обращали внимание, что тромбоз отмечался в кровеносных сосудах как мелко-, так и крупного калибра, в том числе артериального и венозного типа.

Подобные морфологические изменения описаны и другими специалистами [22–25]. Наряду с этими изменениями имелись признаки пневмонита с явлениями организации и развитием интерстициального фиброза, наличием гиалиновых мембран в стенках альвеол. В одном наблюдении встретился так называемый паукообразный фиброз с перестройкой ткани паренхимы. В остальных органах – головном мозге, коже, печени, сердце, почках – определялись два типа морфологических изменений сосудов: 1) без повреждения эндотелия сосудов и тромбоза и 2) с повреждением эндотелиоцитов в сочетании с разрывами базальной мембраны и тромбозом. При этом периваскулярная воспалительная реакция отсутствовала. По мнению исследователей, COVID-19 представляет собой системное сосудистое заболевание, в основе которого лежит повреждение

или некроз эндотелиоцитов сосудов с формированием микротромбов, которые наиболее выражены в коже, головном мозге, печени [21, 26, 27].

T. Iba et al. считают, что при COVID-19 возникает местная и системная гиперкоагуляция [28]. По их мнению, местная гиперкоагуляция обусловлена микроангиопатией, в то время как системная связана с дефектом свертывания крови, который приводит к тромбозу крупных сосудов и является причиной развития тромбоза легочной артерии.

T. Menter et al. провели анализ 21 аутопсии умерших при COVID-19 и показали, что такие коморбидные состояния как ожирение, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца могут способствовать усилению тяжести инфекционного заболевания [20].

Аналогичные результаты были описаны другими исследователями [29–31]. По мнению авторов, непосредственной причиной смерти пациентов с COVID-19 является острая дыхательная недостаточность, в основе которой лежат диффузное альвеолярное повреждение и выраженное полнокровие капилляров в сочетании с микротромбами [20]. Это мнение сопоставимо с данными других исследователей [32, 33].

В работе С. Magro et al. показано, что при COVID-19 возникает пневмонит, который сопровождается развитием паукообразного повреждения межальвеолярных перегородок с вовлечением капилляров и образованием в них фибриновых тромбов с окружающей инфильтрацией нейтрофилами. Морфологические изменения, характерные для цитопатического действия вируса, обнаружены не были. Проявления острого альвеолярного повреждения с наличием гиалиновых мембран, воспалительной реакции, гиперплазии пневмоцитов II типа – классических признаков острого респираторного дистресс-синдрома были слабо выражены. Такой быстро прогрессирующий вариант течения обусловлен, вероятно, тромботической васкулопатией и является проявлением синдрома микроваскулярного повреждения с участием системы комплемента [19, 21].

В другом обзоре, представленном T. Iba et al. [34], имеются данные, что диффузное альвеолярное повреждение и микрососудистый тромбоз легких являются основными причинами острой дыхательной недостаточности при COVID-19. Эндотелиопатия, возникшая под действием SARS-CoV-2, приводит к развитию коагулопатии с формированием микротромбов в артериях и венах крупного и мелкого калибра, капиллярах разных органов. Кроме эндотелиального повреждения COVID-19 может стать причиной васкулита как проявления системной воспалительной реакции [34].

В обзоре K. Hasan et al. представлены сведения, что при инфекции, вызванной SARS-CoV-2, возникает эндотелиальное повреждение как результат цитопатического действия вируса без последующей воспалительной реакции [35].

Тем не менее остается до конца неясным, в каких случаях COVID-19 возникает эндотелиопатия, а в ка-

ких васкулит, каков механизм развития данных патологических процессов.

### **Эндотелиопатия, эндотелиит, микроангиопатия, неангиогенез при COVID-19**

До сих пор в современной литературе нет единого мнения относительно особенностей сосудистого повреждения при COVID-19. Одни авторы считают, что при новой коронавирусной инфекции возникают микроангиопатия и тромбоз [28], другие полагают, что эндотелиит и эндотелиолит [36, 37].

По мнению M. Ackermann et al., основанному на результатах семи аутопсий, при COVID-19 в легких могут быть выделены три группы сосудистых повреждений [38]. Первая группа представлена эндотелиальным повреждением, разрывом клеточных мембран, при этом в цитоплазме эндотелиоцитов имеются вирионы. Вторая группа изменений характеризуется микроангиопатией с преимущественным поражением капилляров, наличием в них тромбов. И наконец, в третьей группе сосудистые повреждения проявляются неангиогенезом с наличием почкующихся и непочкующихся тонкостенных сосудов ткани легких. По мнению авторов, различные сосудистые изменения могут по-разному влиять на клиническое течение COVID-19.

При оценке поражения сосудов легких при COVID-19 следует принимать во внимание, что после цитопатического действия вируса на клетки (альвеолоциты, эндотелиоциты, иммунокомпетентные клетки – макрофаги, лимфоциты) до реализации морфологических изменений в сосудах легких может пройти определенное время, что важно учитывать при оценке тяжести прогноза заболевания [39, 40].

По нашим данным, основанным на результатах патологоанатомического исследования 40 аутопсий умерших при COVID-19, наиболее выраженные альтеративные изменения в сосудах микроциркуляторного русла легких встречаются через 15–21 сутки от начала заболевания. Альтеративные изменения микрососудов легких представлены некрозом эндотелиоцитов, тромбозом капилляров, нейтрофильной инфильтрацией стенок, что, несомненно, способствует деструкции альвеолярных перегородок и усилению тяжести гипоксемии. На наш взгляд, указанный период является критическим в формировании порочного круга развития патологических процессов в легких (микротромбообразование, пневмонии) [41].

Наши данные согласуются с результатами других авторов [42], которые считают, что при COVID-ассоциированной пневмонии характерна комбинация нескольких патологических процессов – трахеобронхит, острое альвеолярное повреждение, повреждение сосудов с наличием тромбов в сосудах мелкого и крупного калибра.

В исследовании [43], основанном на результатах анализа 41 аутопсии, было показано, что при COVID-19 в сосудах легких имеются тромбы разной давности



вплоть до признаков организации, что является частой морфологической особенностью заболевания. При этом в ряде наблюдений обнаруживаются вирусинфицированные пневмоциты и эндотелиоциты кровеносных сосудов в течение всего периода болезни.

Существуют сведения об особенностях поражения сосудов легких в эксперименте. Так, в работе L. Allnoch et al., выполненной на 10 золотистых сиринжских хомячках, интраназально инфицированных SARS-CoV-2 и выведенных из эксперимента через 1, 3, 6, 14 суток, было показано, что при SARS-CoV-2-ассоциированной инфекции в сосудах легких отмечались гипертрофия эндотелиоцитов, эндотелиолит, васкулит [44]. Воспалительный компонент в стенках сосудов легких и периваскулярно был представлен преимущественно макрофагами с небольшим количеством Т-лимфоцитов и нейтрофилов. Авторы полагают, что утрата в эндотелиоцитах сосудов аквапорина-1 – белка, формирующего специфичный водный канал в клеточной мембране, приводит к интерстициальному отеку легочной ткани, что в дальнейшем запускает развитие ее повреждений.

### Возможные механизмы повреждения сосудов легких при COVID-19

Механизмы возможных патологических процессов в кровеносных сосудах легких при COVID-19 (микроангиопатия, васкулит, эндотелиит, эндотелиолит, микротромбоз) до конца не расшифрованы, что обусловлено различными методическими подходами к их оценке и, вероятно, разными стадиями развития инфекционного процесса.

Так, в работе С. Magro et al. показано, что в основе развития повреждений сосудов легких лежит преципитация крупных депозитов системы комплемента (C5b-9), мембраноатакующего комплекса, C4d, маннозосвязывающего лектина, ассоциированного с сериновой протеазой (MBL-МАСP2) [21]. По-видимому, активация системы комплемента усиливает прокоагулянтный статус и может вызывать развитие синдрома микроваскулярного повреждения, то есть ДВС-синдрома [45, 46].

U.R. Anoop et al. предполагают, что возникновение отека легких и микротромбоз сосудов являются нейронными по своей природе и обусловлены воспалительным повреждением nucleus tractus solitarius (NTS) головного мозга [47].

В работе S. Nagashima et al., основанной на сравнительном анализе аутопсий шести умерших при COVID-19 и гриппа H1N1 (10 случаев) и дополненной иммуногистохимическим исследованием с помощью антител к IL-6, TNF-α, ICAM-1, каспазе 1, было показано, что в основе эндотелиальной дисфункции при COVID-19 лежит пироптоз, вариант клеточной гибели [48]. Данный механизм повреждения клеток эндотелия способствует возникновению системного микротромбоза сосудов, что значительно утяжеляет клиническое течение болезни.

### Заключение

COVID-19 представляет собой инфекционное заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2, с системным поражением органов и тканей (легкие, сердце, печень, почки, головной мозг, кожа) и сосудов. При этом поражение сосудов в виде микротромбов, микроангиопатии, микроваскулита, эндотелиита, обусловленное различными механизмами, может существенно ухудшать клиническое течение заболевания за счет прогрессирования тканевой гипоксии. Патологоанатомическое исследование легких на материале аутопсий умерших при COVID-19 с применением доказательных методов исследования (гистологический, гистохимический, иммуногистохимический) позволит уточнить особенности альтеративных, воспалительных изменений, репаративных процессов в стенках сосудов, неоангиогенеза в разные сроки развития заболевания.

### Литература/References

1. Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-CoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV. Вопросы вирусологии. 2020;65(1):6–15. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15.  
*Lvov DK, Alkhovskiy SV, Kolobukhina LV, Burtseva EI.* Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak. Problems of Virology. 2020;65(1):6–15 (In Russ.). DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15.
2. World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (accessed 21.03.2022).
3. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the 8th meeting of the IHR Emergency Committee on COVID-19 – 14 July 2021. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (accessed 21.03.2022).
4. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10 (08.02.2021). Утверждены Министерством здравоохранения Российской Федерации. Interim Guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 10 (08.02.2021). Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation.
5. Сугралиев А.Б. Поражения сердца у больных COVID-19. Кардиология. 2021;61(4):15–23. DOI: 10.18087/cardio.2021.4.n1408.  
*Sugraliyev AB.* Cardiac Involvement in COVID-19. *Kardiologiya.* 2021;61(4):15–23 (In Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2021.4.n1408.

6. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802–10. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
8. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
9. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;191:145–7. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.
10. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054–62. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
11. Рыбакова М.Г., Карев В.Е., Кузнецова И.А. Патологическая анатомия новой коронавирусной инфекции COVID-19. Первые впечатления. *Архив патологии.* 2020;82(5):5–15. DOI: 10.17116/patol2020820515.  
Rybakova MG, Karev VE, Kuznetsova IA. Anatomical pathology of novel coronavirus (COVID-19) infection. First impressions. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii.* 2020;82(5):5–15 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol2020820515.
12. Tan HW, Xu YM, Lau ATY. Angiotensin-converting enzyme 2: The old door for new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Rev Med Virol.* 2020;30(5):e2122. DOI: 10.1002/rmv.2122.
13. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity.* 2020;52(5):731–3. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.003.
14. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395(10224):565–74. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
15. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281–292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
16. Ковригина А.М., Шаламова Е.А., Березовский Ю.С., Калинин Д.В., Грецов Е.М., Багдасарян Т.Р. и др. Патоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика изменений лимфатических узлов у умерших от COVID-19 по данным аутопсий. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(4):12–23. DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23.  
Kovrigina AM, Shalamova EA, Berezovskiy YuS, Kalinin DV, Gretsov EM, Bagdasaryan TR et al. Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study). *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(4):12–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23.
17. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: A key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355–62. DOI: 10.1038/s41577-020-0331-4.
18. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Благова О.В., Куклева А.Д., Богачева Г.А., Курилина Э.В. и др. Миокардит у пациентов с COVID-19, подтвержденный результатами иммуногистохимического исследования. *Кардиология.* 2020;60(7):4–10. DOI: 10.18087/cardio.2020.7.n1209.  
Kogan EA, Berezovskiy YuS, Blagova OV, Kukleva AD, Bogacheva GA, Kurilina EV et al. Myocarditis in patients with COVID-19 confirmed by immunohistochemical. *Kardiologiya.* 2020;60(7):4–10 (In Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2020.7.n1209.
19. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, Nuovo G, Salvatore S, Harp J et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl Res.* 2020;220:1–13. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.04.007.
20. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology.* 2020;77(2):198–209. DOI: 10.1111/his.14134.
21. Magro CM, Mulvey J, Kubiak J, Mikhail S, Suster D, Crowson AN et al. Severe COVID-19: A multifaceted viral vasculopathy syndrome. *Ann Diagn Pathol.* 2021;50:151645. DOI: 10.1016/j.anndiagnpath.2020.151645.
22. Miesbach W, Makris M. COVID-19: Coagulopathy, risk of thrombosis, and the rationale for anticoagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2020;26:1076029620938149. DOI: 10.1177/1076029620938149.
23. Levi M. COVID-19 coagulopathy vs disseminated intravascular coagulation. *Blood Adv.* 2020;4(12):2850. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002197.
24. Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020;25(5):471–8. DOI: 10.1177/1358863X20932640.
25. Забозлаев Ф.Г., Кравченко Э.В., Галлямова А.Р., Летуновский Н.Н. Патологическая анатомия легких при новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Предварительный анализ аутопсийных исследований. *Клиническая практика.* 2020;11(2):21–37. DOI: 10.17816/clinpract34849.  
Zabozlaev FG, Kravchenko EV, Gallyamova AR, Letunovskiy NN. Pulmonary pathology of the new coronavirus disease (Covid-19). The preliminary analysis of post-mortem findings. *Journal of Clinical Practice.* 2020;11(2):21–37 (In Russ.). DOI: 10.17816/clinpract34849.
26. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* 2020;7(6):e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
27. Vishwajeet V, Purohit A, Kumar D, Vijayvergia P, Tripathi S, Kanchan T et al. Evaluation of liver histopathological findings of coronavirus disease 2019 by minimally invasive autopsies. *J Clin Exp Hepatol.* 2022;12(2):390–7. DOI: 10.1016/j.jceh.2021.07.004.

28. Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of coronavirus disease 2019. *Crit Care Med.* 2020;48(9):1358–64. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004458.
29. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 2020;395(10234):1417–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
30. Nizzoli ME, Merati G, Tenore A, Picone C, Consensi E, Perotti L et al. Circulating endothelial cells in COVID-19. *Am J Hematol.* 2020;95(8):E187–E188. DOI: 10.1002/ajh.25881.
31. Giusti B, Gori AM, Alessi M, Rogolino A, Lotti E, Poli D et al. Sars-CoV-2 induced coagulopathy and prognosis in hospitalized patients: A snapshot from Italy. *Thromb Haemost.* 2020;120(8):1233–6. DOI: 10.1055/s-0040-1712918.
32. Guan WJ, Liang WH, Zhao Y, Liang HR, Chen ZS, Li YM et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: A nationwide analysis. *Eur Respir J.* 2020;55(5):2000547. DOI: 10.1183/13993003.00547-2020.
33. Yamaoka-Tojo M. Vascular endothelial glycocalyx damage in COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9712. DOI: 10.3390/ijms21249712.
34. Iba T, Connors JM, Levy JH. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2020;69(12):1181–9. DOI: 10.1007/s00011-020-01401-6.
35. Siddiqi HK, Libby P, Ridker PM. COVID-19 – A vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2021;31(1):1–5. DOI: 10.1016/j.tcm.2020.10.005.
36. Благова О.В., Коган Е.А., Лутохина Ю.А., Куклева А.Д., Айнетдинова Д.Х., Новосадов В.М. и др. Постковидный миоэндокардит подострого и хронического течения: клинические формы, роль персистенции коронавируса и аутоиммунных механизмов. *Кардиология.* 2021;61(6):11–27. DOI: 10.18087/cardio.2021.6.n1659.
- Blagova OV, Kogan EA, Lutokhina YuA, Kukleva AD, Ainetdinova DH, Novosadov VM et al. Subacute and chronic post-covid myoendocarditis: clinical presentation, role of coronavirus persistence and autoimmune mechanisms. *Kardiologiya.* 2021;61(6):11–27 (In Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2021.6.n1659.
37. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Михалева Л.М., Крупнов Н.М. и др. Патологическая анатомия COVID-19: опыт 2000 аутопсий. Судебная медицина. 2020;6(4):10–23. DOI: 10.19048/fm340.
- Zayratyants OV, Samsonova MV, Cherniaev AL, Mishnev OD, Mikhaleva LM, Krupnov NM et al. COVID-19 pathology: experience of 2000 autopsies. *Russian Journal of Forensic Medicine.* 2020;6(4):10–23 (In Russ.). DOI: 10.19048/fm340.
38. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(2):120–8. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432.
39. Zhang J, Tecson KM, McCullough PA. Endothelial dysfunction contributes to COVID-19-associated vascular inflammation and coagulopathy. *Rev Cardiovasc Med.* 2020;21(3):315–9. DOI: 10.31083/j.rcm.2020.03.126.
40. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, Chang CH, Zhang H, Bahel P et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: Evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 2020;7(8):e575–e582. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30216-7.
41. Тодоров С.С., Дерibas В.Ю., Казьмин А.С., Резникова Г.Л., Макаренко Ю.М., Полесовой Ф.В. и др. Патоморфологические изменения в сосудах легких в разные сроки летальных исходов больных при COVID-19. *Медицинский вестник Юга России.* 2021;12(2):54–61. DOI: 10.21886/2219-8075-2021-12-2-54-61.
- Todorov SS, Deribas VYu, Kazmin AS, Reznikova GL, Makarenko YuM, Polesovoy FV et al. Pathomorphological changes in pulmonary vessels at different terms of lethal outcomes of patients with COVID-19. *Medical Herald of the South of Russia.* 2021;12(2):54–61 (In Russ.). DOI: 10.21886/2219-8075-2021-12-2-54-61.
42. Borczuk AC, Salvatore SP, Seshan SV, Patel SS, Bussel JB, Mostyka M et al. COVID-19 pulmonary pathology: A multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Mod Pathol.* 2020;33(11):2156–68. DOI: 10.1038/s41379-020-00661-1.
43. Bussani R, Schneider E, Zentilin L, Collesi C, Ali H, Braga L et al. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBio-Medicine.* 2020;61:103104. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103104.
44. Allnoch L, Beythien G, Leitzen E, Becker K, Kaup FJ, Stanelle-Bertram S et al. Vascular inflammation is associated with loss of aquaporin 1 expression on endothelial cells and increased fluid leakage in SARS-CoV-2 infected golden Syrian hamsters. *Viruses.* 2021;13(4):639. DOI: 10.3390/v13040639.
45. Jung F, Krüger-Genge A, Franke RP, Hufert F, Küpper JH. COVID-19 and the endothelium. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2020;75(1):7–11. DOI: 10.3233/CH-209007.
46. Jayarangaiah A, Kariyanna PT, Chen X, Jayarangaiah A, Kumar A. COVID-19-associated coagulopathy: An exacerbated immunothrombosis response. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2020;26:1076029620943293. DOI: 10.1177/1076029620943293.
47. U R A, Verma K. Pulmonary edema in COVID19 – A neural hypothesis. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(14):2048–50. DOI: 10.1021/acscemneuro.0c00370.
48. Nagashima S, Mendes MC, Camargo Martins AP, Borges NH, Godoy TM, Miggiolaro AFRDS et al. Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 – Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(10):2404–7. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314860.

### Информация об авторах

Сергей Сергеевич Тодоров – доктор медицинских наук, врач-патологоанатом, заведующий кафедрой патологической анатомии, профессор кафедры, руководитель морфологического отдела Ростовского государственного медицинского университета.

Андрей Сергеевич Казьмин – врач-патологоанатом, ассистент кафедры патологической анатомии Ростовского государственного медицинского университета.

Виктория Юрьевна Дерибас – врач-патологоанатом, заведующая отделением патологической анатомии, ассистент кафедры патологической анатомии Ростовского государственного медицинского университета.

Сергей Сергеевич Тодоров (мл.) – студент 4-го курса лечебно-профилактического факультета Ростовского государственного медицинского университета.

#### **Author information**

Sergey S. Todorov – Dr. Sci. (Med.), Pathologist, Head of the Morphological Department, Professor, Department of Pathology, Rostov State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-8476-5606>

Andrey S. Kazmin – Pathologist, Assistant, Department of Pathological Anatomy, Rostov State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-0934-3416>

Victoria Yu. Deribas – Pathologist, Head of the Department of Pathological Anatomy, Assistant, Department of Pathological Anatomy, Rostov State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-4541-6707>

Sergey S. Todorov (Jr.) – 4rd year student, Faculty of Treatment and Prevention, Rostov State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-4787-4031>

## ABC-транспортеры в формировании лекарственной устойчивости к платиносодержащим препаратам при серозной карциноме яичников

Е.П. Ульянова, Е.М. Непомнящая, Г.В. Жукова, А.Б. Сагакянц, Д.Ю. Якубова, О.Г. Шульгина

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** *Введение.* Серозная карцинома яичников – это группа крайне агрессивных злокачественных опухолей с высокой частотой летальных исходов, поэтому на сегодняшний день она остается наиболее прогностически неблагоприятным раком женских половых органов во всем мире. Одной из причин этой ситуации является развитие множественной лекарственной устойчивости при применении разных схем химиотерапии. В связи с этим перспективен поиск эффективных маркеров резистентности к химиопрепаратам при данной патологии. Цель исследования – изучить экспрессию ABC-транспортеров Pgp (ABCB1) и BCRP (ABCG2) в клетках серозных карцином (high-grade) яичников пациенток с различной чувствительностью к платиносодержащим режимам полихимиотерапии. *Материалы и методы.* Клиническим материалом послужили ткани опухолей 100 пациенток в возрасте от 29 до 79 лет с серозной карциномой яичников высокой степени злокачественности (high-grade), III–IV стадией заболевания. Для иммуногистохимического метода использовались поликлональные кроличьи антитела к P Glycoprotein1 (Pgp или MDR1) и моноклональные мышинные антитела к BCRP (клон JF0994), с применением системы детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0 (StatSoftInc., США). Определяли критерий Манна–Уитни, критерий  $\chi^2$  Пирсона, отношения шансов с доверительным интервалом.

*Результаты.* Показано, что в группах с платинорезистентностью и платиночувствительностью преобладали пациентки с Pgp+ (98% и 68%) и BCRP+ (90% и 81,4%) опухолями. Значения экспрессии Pgp и BCRP в опухолевых клетках у платинорезистентных пациенток (70;40–100 и 65;45–90) были статистически выше – в 1,8 раза ( $p=0,003$ ) и в 1,9 раза ( $p=0,013$ ), соответственно, по сравнению с платиночувствительными пациентками (40;4–65 и 35;10–60), по U-критерию Манна–Уитни.

*Заключение.* Полученные результаты в отношении маркера Pgp показывают возможность использовать его в качестве предиктивного фактора при серозных карциномах (high-grade) яичников.

**Ключевые слова:** серозная карцинома яичников, множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортеры, Pgp, BCRP

**Для корреспонденции:** Елена Петровна Ульянова. E-mail: uljanova\_elenal@lenta.ru

**Для цитирования:** Ульянова Е.П., Непомнящая Е.М., Жукова Г.В., Сагакянц А.Б., Якубова Д.Ю., Шульгина О.Г. ABC-транспортеры в формировании лекарственной устойчивости к платиносодержащим препаратам при серозной карциноме яичников. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):13–21. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.13-21.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Национального медицинского исследовательского центра онкологии Минздрава России (№ 121031100251-9).

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

Статья поступила 06.10.2021. Получена после рецензирования 23.11.2021. Принята в печать 16.12.2021.

## ABC transporters in the development of platinum drug resistance in serous ovarian carcinoma

E.P. Ulianova, E.M. Nepomnyashchaya, G.V. Zhukova, A.B. Sagakyants, D.Yu. Yakubova, O.G. Shulgina

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Serous ovarian carcinoma is a group of extremely aggressive malignant tumors with high mortality rates; today, it remains the most prognostically unfavorable gynecologic cancer in the world. One of the causes is the development of multidrug resistance after administration of various chemo-

therapy regimens. Therefore, the search for effective markers of resistance to chemotherapy in this disease is promising. The purpose of this study was to analyze expressions of ABC transporters Pgp (ABCB1) and BCRP (ABCG2) in cells of high-grade serous ovarian carcinomas in patients with varying sensitivity to platinum-based polychemotherapy.

**Materials and methods.** Tumor tissues of 100 patients aged 29–79 years with high-grade serous ovarian carcinomas and stages III–IV were studied with immunohistochemical method with rabbit P-glycoprotein 1 (Pgp or MDR1) polyclonal antibodies and by the Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System with mouse monoclonal BCRP antibodies (JF0994 clone). We used the Statistica 13.0 program (StatSoft Inc., USA) to analyze the results. We determined the Mann–Whitney U and Pearson's  $\chi^2$  values, as well as odds ratios with CI.

**Results.** In groups with platinum resistance and platinum sensitivity, there prevailed patients with Pgp+ (98% and 68%) and BCRP+ (90% and 81.4%). Mann–Whitney U-test showed that in cancer cells in platinum-resistant patients, the expression of Pgp and BCRP (70;40–100 and 65;45–90) was 1.8 ( $p=0.003$ ) and 1.9 times ( $p=0.013$ ) higher, respectively, than in platinum-sensitive patients (40;4–65 and 35;10–60).

**Conclusion.** The results on the Pgp marker show that it can be used as a predictive factor in high-grade serous ovarian carcinomas.

**Keywords:** serous ovarian carcinoma, multidrug resistance, ABC transporters, Pgp, BCRP

**Corresponding author:** Elena P. Ulianova. E-mail: uljanova\_elena@lenta.ru

**Forcitation:** Ulianova E.P., Nepomnyashchaya E.M., Zhukova G.V., Sagakyants A.B., Yakubova D.Yu., Shulgina O.G. ABC transporters in the development of platinum drug resistance in serous ovarian carcinoma. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):13–21 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.13–21.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to National Medical Research Centre for Oncology (No. 121031100251-9).

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

**Received** 06.10.2021. **Received in revised form** 23.11.2021. **Accepted** 16.12.2021.

## Введение

Согласно последним данным, основным препятствием в лечении онкологических заболеваний с помощью химиотерапии является быстрое развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) клеток опухоли к действию цитотоксических препаратов. Возникновение МЛУ связывают не только с плохим ответом на химиотерапию, но и с плохим прогнозом, так как этот биологический феномен опухолевой клетки является защитным, а иногда и приобретенным во время прогрессирования опухоли на фоне уже проводимой терапии [1, 2]. Таким образом, МЛУ расценивается как признак выраженной злокачественности и агрессивности опухолевых клонов, который ухудшает прогноз [3]. Феномен МЛУ в настоящее время связывают с наличием на клеточной мембране опухолевых клеток специфических трансмембранных белков-переносчиков – ABC-транспортеров, способных удалять из клетки гидрофобные цитотоксические соединения [4]. Семейство, к которому относятся данные белки, подразделяется на подсемейства А, В, С, D, E, F и G в зависимости от структуры АТФ-связывающих доменов и насчитывает около 50 белков, три из которых – ABCB1 (Pgp или MDR1), ABCG2 (BCRP) и ABCC1 (MRP) – имеют значение в развитии феномена МЛУ при раке яичников [5, 6]. Среди различных механизмов МЛУ опухолей наиболее изучена повышенная активность белка семейства ABC (АТР binding cassette) Р-гликопротеина (Pgp), кодируемого геном *MDR1* (ABCB1). Белок Pgp, используя энергию

аденозинтрифосфата, транспортирует группы различающихся по структуре веществ из цитозоля во внеклеточное пространство. Данный белок способствует снижению внутриклеточной концентрации препарата, тем самым уменьшая цитотоксичность противоопухолевых препаратов, таких как антрациклины, винкалалоиды, подофиллотоксины и таксаны [7–9]. Значительный массив информации накоплен также о BCRP, кодируемом геном *ABCG2*, представителе подсемейства G, гиперэкспрессия которого в злокачественных клетках приводит к устойчивости опухоли к широкому спектру лекарственных соединений [10]. Тем не менее, несмотря на десятилетия исследований данных транспортеров, сегодня ни одно из клинических испытаний, основанных на ингибировании транспорта лекарственных препаратов, не увенчалось успехом, поэтому поиск путей преодоления развития множественной лекарственной устойчивости посредством маркеров-мишеней для применения наиболее эффективных лекарственных препаратов является актуальной проблемой современной онкологии в целом и онкогинекологии в частности. Целью исследования стала оценка экспрессии ABC-транспортеров Pgp (ABCB1) и BCRP (ABCG2) в клетках серозных карцином яичников пациенток с различной чувствительностью к платиносодержащим режимам полихимиотерапии.

## Материалы и методы

Клиническим материалом для настоящего исследования послужили ткани опухолей 100 пациенток в воз-

расте от 29 до 79 лет с серозной карциномой яичников высокой степени злокачественности (high-grade), ПС–IV стадией заболевания. В зависимости от результата после проведения лечения их разделили на две группы: 1-я группа – пациентки с платиночувствительностью к проведению химиотерапии (59 человек) и 2-я группа – пациентки с платинорезистентностью на этапах лечения или через 6 месяцев после завершения специального лечения (41 человек). Группы были сопоставимы по распространенности процесса, гистологическому типу, статусу общего состояния. Химиотерапию проводили по следующим схемам:

- паклитаксел 175–225 мг/м<sup>2</sup> в первый день + карбоплатин АУС 5–7 в первый день; на фоне гипергидратации, форсированного диуреза, под прикрытием антиэметических средств;
- паклитаксел 175–200 мг/м<sup>2</sup> в первый день + цисплатин 60–80 мг/м<sup>2</sup> в первый день; цикл 21 день;
- доцетаксел 75 мг/м<sup>2</sup> в первый день + цисплатин 75 мг/м<sup>2</sup> в первый день; цикл 21 день.

Интервал между циклами полихимиотерапии составлял 4 недели. Вторым этапом комплексного лечения был хирургический, после которого пациенткам обеих групп проводили от пяти до шести циклов адьювантной полихимиотерапии. После завершения лечения динамическое наблюдение осуществляли ежемесячно в течение первого года, в течение второго года – один раз в три месяца, в последующем – один раз в полгода.

Морфологические исследования выполняли на базе патологоанатомического отделения НМИЦ онкологии Минздрава России (Ростов-на-Дону). Для фиксации материала использовали раствор 10% нейтрального забуференного формалина с последующей стандартной проводкой. Далее приготавливали срезы толщиной 3–5 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Для ИГХ исследования применяли протокол, опубликованный ранее [11]. Использовали поликлональные кроличьи антитела к PGlycoprotein1 (Pgp или MDR1) фирмы Affinity Biosciences (США) в разведении 1:600 и моноклональные мышьиные антитела к VCRP (клон JF0994) фирмы Hangzhou HuaAn Biotechnology Co. Ltd. (Китай) в разведении 1:300. Исследование проводили на автостейнере ThermoScientific 480S (Thermo Fisher Scientific, США) с применением системы детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Оценивали процентное содержание и интенсивность окрашивания: 0, 1+ (слабое), 2+ (умеренное), 3+ (сильное). Экспрессия белков Pgp и VCRP определялась как положительная,

когда окрашивание было выявлено в более 10% (cut-off) опухолевых клеток с интенсивностью 2+ и 3+. Оценку результатов иммуногистохимической реакции проводили с применением светового микроскопа AxioLab.A1 (Zeiss, Германия) при увеличении объектива  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica 13,0 (StatSoft Inc., США). Изучаемые данные проверяли на соответствие нормальному распределению по критерию Шапиро–Уилка.

В связи с тем, что вариационный ряд не подчинялся закону нормального распределения, сравнение групп проводилось с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U-критерий) и критерия  $\chi^2$  Пирсона. Дополнительно оценивали отношение шансов (ОШ) и статистическую значимость отношения шансов, исходя из значений 95% доверительного интервала (ДИ).

## Результаты

В результате исследования установлено, что в группах как с платинорезистентностью, так и с платиночувствительностью преобладали пациентки с опухолями Pgp+ (98% и 68%, соответственно) (рис. 1).

На рисунке 2 продемонстрированы различные варианты экспрессии Pgp в опухолевой ткани пациенток изучаемых групп.

Разброс опухолевых клеток, окрашенных положительно антителами к Pgp, у пациенток из исследуемых групп был достаточно неоднородным. В группе с платинорезистентностью встречались опухоли со 100% экспрессией данного маркера, тогда как у пациенток из группы с платиночувствительностью максимальная экспрессия в опухолевых клетках достигала лишь 65%, причем только у 10% женщин (шесть из 59). Значения экспрессии Pgp в ткани опухоли у пациенток из группы «резистентные» к платиносодержащим препаратам были статистически выше в 1,8 раза по сравнению с опухолями пациенток из группы «чув-

Долевое соотношение опухолей с экспрессией Pgp в исследуемых группах | Fractional ratio of tumors with Pgp expression in the studied groups

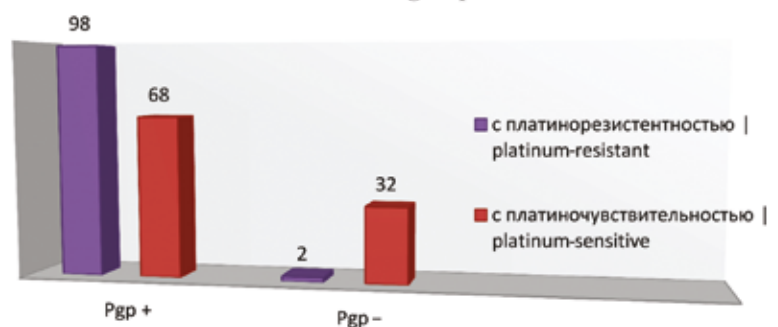


Рис. 1. Долевое соотношение опухолей с положительной и отрицательной экспрессией Pgp в исследуемых группах (%)

Fig. 1. Fractional ratio of tumors with positive and negative Pgp expression in the studied groups (%)

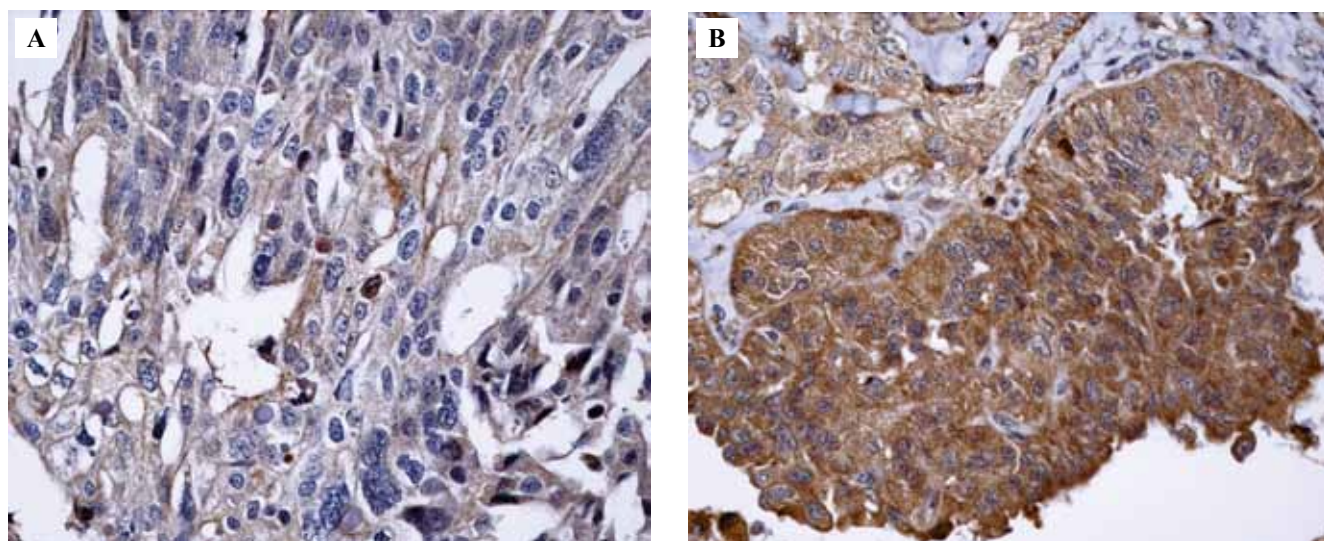


Рис. 2. Экспрессия Pgp в опухолевых клетках.

А – группа с платиночувствительностью (низкая степень интенсивности – 1+), ×400.

В – группа с платинорезистентностью (высокая степень интенсивности – 3+), ×400

Fig. 2. Pgp expression in cancer cells.

А – platinum-sensitive group (low intensity – 1+), ×400. В – platinum-resistant group (high intensity – 3+), ×400

ствительные» к платиносодержащим препаратам по U-критерию Манна–Уитни (табл. 1).

При оценке межгрупповых различий в распределении случаев с положительной и отрицательной экспрессией по критерию  $\chi^2$  Пирсона было показано, что преобладание пациенток с положительным статусом Pgp в группе с платинорезистентностью имело статистиче-

скую значимость по сравнению с таковыми из группы с платиночувствительностью (16,300,  $p < 0,001$ ). Таким образом, наличие положительного Pgp в опухолевых клетках как фактора риска в группе с платинорезистентностью увеличивало шансы невосприимчивости к терапии платиносодержащими препаратами в 19 раз (95% ДИ 2,4–148,8). Данные приведены в таблице 2.

Таблица 1 | Table 1

Выраженность экспрессии Pgp в опухолях яичников пациенток исследуемых групп | Levels of Pgp expression in ovarian tumors in patients of the studied groups

	Группы исследования   Patient groups				p
	пациентки с платинорезистентностью (n=41)   platinum-resistant patients (n=41)		пациентки с платиночувствительностью (n=59)   platinum-sensitive patients (n=59)		
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	
Pgp, %	70	40–100	40	4–65	0,003*

\* – отличия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ) (критерий Манна–Уитни)

\* – statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) (Mann–Whitney U-test)

Таблица 2 | Table 2

Количество пациенток исследуемых групп с положительной и отрицательной экспрессией Pgp в опухолях яичников | The number of patients in the study groups with positive and negative Pgp expression in ovarian tumors

Группы   Groups	Фактор риска   Risk factor		p	ОШ, 95% ДИ   OR, 95% CI
	Pgp+	Pgp–		
	Абсол.   Absol.	Абсол.   Absol.		
Пациентки с платинорезистентностью   Platinum-resistant patients	40	1	<0,001*	19,0 2,4–148,8
Пациентки с платиночувствительностью   Platinum-sensitive patients	40	19		

\* – отличия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ) (критерий  $\chi^2$  Пирсона)

\* – statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) (Pearson's  $\chi^2$  test)



В результате исследования экспрессии BCRP были получены неоднозначные результаты. Хотя наибольшее число пациенток с положительной экспрессией

данного маркера в опухолях и наблюдалось в группе с платинорезистентностью, однако в группе с платиночувствительностью пациенток с опухолями, имеющими положительную экспрессию BCRP, было незначительно меньше, всего на 8,6% (рис. 3).

На рисунке 4 показаны различные варианты экспрессии BCRP в опухолевой ткани пациенток изучаемых групп.

Разброс опухолевых клеток в ткани, окрашенных положительно маркером BCRP, у пациенток из исследуемых групп был также неоднородным. У пациенток с платинорезистентностью преобладали опухоли, имеющие более высокие значения экспрессии BCRP (до 90%). У пациенток с платиночувствительностью встречались опухоли с минимальным значением экспрессии (10%), а максимальные значения не превышали 60%. Значения экспрессии BCRP в опухолях у пациенток из группы с платинорезистентностью были статистически выше – в 1,9 раза по сравнению с опухолями

**Долевое соотношение опухолей с экспрессией BCRP в исследуемых группах | Fractional ratio of tumors with BCRP expression in the studied groups**

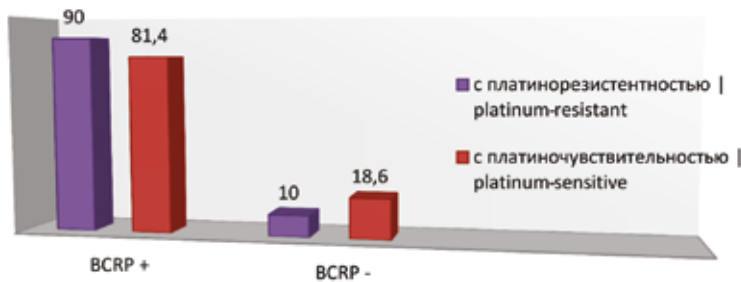


Рис. 3. Долевое соотношение опухолей с положительной и отрицательной экспрессией BCRP в исследуемых группах (%)

Fig. 3. Fractional ratio of tumors with positive and negative BCRP expression in the studied groups (%)

Таблица 3 | Table 3

**Выраженность экспрессии BCRP в опухолях яичников пациенток исследуемых групп | Levels of BCRP expression in ovarian tumors in patients of the studied groups**

	Группы исследования   Patient groups				p
	пациентки с платинорезистентностью (n=41)   platinum-resistant patients (n=41)		пациентки с платиночувствительностью (n=59)   platinum-sensitive patients (n=59)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
BCRP, %	65	45-90	35	10-60	0,013*

\* – отличия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ) (критерий Манна-Уитни)

\* – statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) (Mann-Whitney test)

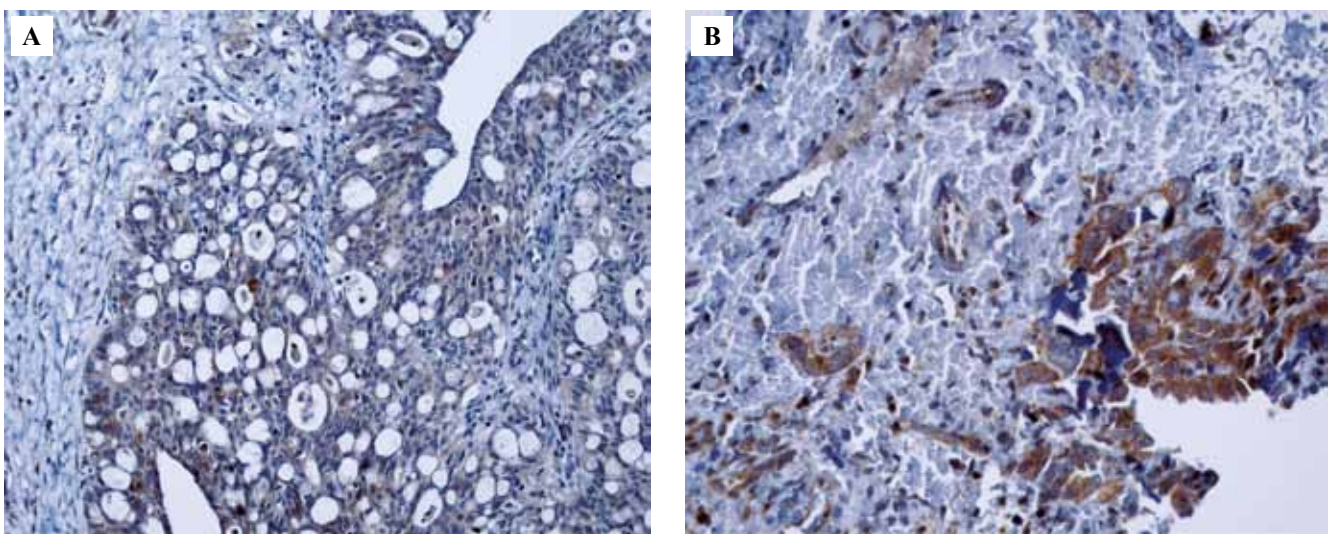


Рис. 4. Экспрессия BCRP в опухолевых клетках.

А – группа с платиночувствительностью (низкая степень интенсивности – 1+),  $\times 400$ .

В – группа с платинорезистентностью (умеренная степень интенсивности – 2+),  $\times 200$

Fig. 4. BCRP expression in cancer cells.

А – platinum-sensitive group (low intensity – 1+),  $\times 400$ . В – platinum-resistant group (moderate intensity – 2+),  $\times 200$

Количество пациенток исследуемых групп с положительной и отрицательной экспрессией BCRP в опухолях яичников | The number of patients in the study groups with positive and negative expression of BCRP in ovarian tumors

Группы   Groups	Фактор риска   Risk factor		p	ОШ, 95% ДИ   OR, 95% CI
	BCRP+	BCRP–		
	Абсол.   Absol.	Абсол.   Absol.		
Пациентки с платинорезистентностью   Platinum-resistant patients	37	4	0,119	2,8 0,7–10,9
Пациентки с платиночувствительностью   Platinum-sensitive patients	48	11		

пациенток из группы с платиночувствительностью по U-критерию Манна–Уитни (табл. 3).

Однако при оценке различий в распределении случаев с положительной и отрицательной экспрессией по критерию  $\chi^2$  Пирсона между исследуемыми группами было показано, что преобладание пациенток с положительным статусом BCRP в опухолях наблюдалось в группе с платиночувствительностью, а не наоборот, как следовало бы ожидать. Правда, статистическая значимость не была отмечена (2,438,  $p=0,119$ ). Данные отражены в таблице 4.

## Обсуждение

Серозная карцинома яичников – это группа крайне агрессивных злокачественных опухолей с высокой частотой летальных исходов, поэтому сегодня она остается наиболее прогностически неблагоприятным раком женских половых органов во всем мире. Несмотря на последние достижения в циторедуктивной хирургии и химиотерапии, 5-летняя выживаемость пациенток при этом заболевании составляет менее 30% [12]. Одной из причин такой ситуации является развитие множественной лекарственной устойчивости при применении различных схем химиотерапии [13]. В связи с этим поиск эффективных маркеров резистентности к химиопрепаратам при серозной карциноме яичников считается перспективным. По данным литературы, основную роль в развитии множественной лекарственной устойчивости играют ABC-транспортеры, анализ которых представлен в нашей работе. Так, например, в исследовании S. Nishida et al. [14] обоснованы положения оценки функционирования активности ABC-транспортеров, маркеров МЛЮ, в прогнозировании эффекта лечения. Авторы подчеркивают, что тяжесть злокачественности фенотипа МЛЮ может определяться не только выраженностью экспрессии отдельных транспортеров, но и в значительной степени числом экспрессированных ABC-транспортеров. Главным механизмом МЛЮ является снижение концентрации препарата внутри опухолевой клетки из-за его чрезмерного выведения в межклеточное пространство, что осуществляет гликопротеин Pgp, кодируемый геном множественной лекарственной устойчивости *MDR1* [15]. Гиперэкспрессия данного гена встреча-

ется в норме в надпочечниках, почках, толстой кишке, а также в опухолях этих органов. Рефрактерность опухолей перечисленных локализаций к химиотерапии связывают с ролью гена *MDR1* [16]. Благодаря гидрофильности таксанов устойчивость к этой группе препаратов связана с геном МЛЮ, а именно увеличение количества иРНК *MDR1* служит фактором устойчивости рака яичников к химиотерапевтическому лечению таксанами [17]. S.P. Cole et al. в 1992 году открыли белок множественной лекарственной устойчивости (*MDR1* или Pgp), который функционирует как аденозин-5-фосфатаза АТФ-зависимая помпа для цитотоксических препаратов [18, 19]. Он транспортирует отрицательно заряженные ионы, конъюгированные с молекулой глутатиона, обеспечивая резистентность к препаратам платины [20]. При отсутствии экспрессии в 100% случаев ответ на химиотерапию наблюдался в 96% случаев. Экспрессия белка *MDR1* была достоверно выше у пациенток, которые не отвечали на первичную терапию паклитакселом и карбоплатином [21]. В нашем исследовании экспрессия белка-транспортера Pgp, кодируемого геном *MDR1*, в серозной карциноме яичников также была статистически выше в 1,8 раза ( $p=0,003$ ) у пациенток с платинорезистентностью. Преобладание пациенток с положительным статусом Pgp в опухоли из группы с платинорезистентностью имело статистическую значимость по сравнению с таковыми из группы с платиночувствительностью ( $p<0,001$ ). Наличие положительного Pgp в опухолевых клетках как фактора риска увеличивало шансы невосприимчивости к терапии платиносодержащими препаратами в 19 раз (95% ДИ 2,4–148,8) в группе с платинорезистентностью. Таким образом, результаты, полученные в ходе нашего исследования, позволили предположить предиктивную значимость показателя экспрессии Pgp.

Вторым по важности переносчиком лекарственных средств является белок лекарственной устойчивости к раку молочной железы (BCRP), кодируемый геном *ABCG2*, впервые клонированный из линии клеток рака молочной железы MCF-7 [22]. Повышенная экспрессия BCRP была отмечена при многих формах рака, включая рак молочной железы [23], рак простаты [24], рак толстой кишки [25, 26]. BCRP широко исследуется на

линиях раковых клеток и известен своим участием в метаболизме, всасывании, распределении, экскреции и токсичности таких препаратов как митоксантрон и топотекан [27, 28]. Тем не менее в работах, посвященных исследованию устойчивости к препаратам, содержащим платину, данные противоречивы. Так, M. Świerczewska et al. отмечали статистически значимо повышенную экспрессию VCRP ( $p < 0,01$ ) у пациентов, которые не отвечали на первичную терапию паклитакселом [29]. Однако в работе R. Januchowski et al., посвященной перекрестной устойчивости к лекарственным средствам [30], сделан вывод, что экспрессия VCRP проявляет устойчивость к терапии доксорубицином, а не паклитакселом или цисплатином. В нашем исследовании участвовали пациентки, которым проводилась терапия платиносодержащими препаратами, поэтому, видимо, с этим и связаны неоднозначные результаты. С одной стороны, значения экспрессии VCRP в опухолях пациенток из группы с платинорезистентностью были статистически значимо ( $p = 0,013$ ) выше – в 1,9 раза по сравнению с опухолями пациенток из группы с платиночувствительностью, а с другой – наличие положительного VCRP как фактора риска в группе с платинорезистентностью не являлось статистически значимым ( $p = 0,119$ ). Кроме того, нами отмечено преобладание пациенток с положительным статусом VCRP в опухоли в группе с платиночувствительностью, а не в группе с платинорезистентностью, как ожидалось. В итоге мы предположили, что полученные результаты изучения экспрессии белка – транспортера VCRP у пациенток с серозной карциномой яичников свидетельствовали о неоднозначной роли данного маркера в прогнозировании результатов применения платиносодержащей химиотерапии при указанной патологии.

## Заключение

Нами изучена экспрессия ABC-транспортеров Pgp (ABCB1) и VCRP (ABCG2) при серозных карциномах яичников и рассмотрена их роль в множественной лекарственной устойчивости. Полученные результаты в отношении маркера Pgp показали возможность использовать его в качестве предиктивного фактора при раковых опухолях яичников. Положительное иммуногистохимическое окрашивание антителами к данному маркеру может быть расценено в качестве еще одного из признаков злокачественности и агрессивности поведения серозной карциномы яичников наряду с традиционными маркерами Ki-67 и p53.

Данное положение может найти применение в клинике с разработкой практических рекомендаций при назначении химиопрепаратов.

## Сокращения

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость  
ИГХ – иммуногистохимическое исследование  
ОШ – отношение шансов  
ДИ – достоверный интервал

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.П. Ульянова, А.Б. Сагакянц.  
Сбор и обработка материала – Д.Ю. Якубова, О.Г. Шульгина.  
Написание текста – Е.П. Ульянова.  
Редактирование – Е.М. Непомнящая, Г.В. Жукова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.P. Ulianova, A.B. Sagakyants.  
Collected the data and performed the analysis – D.Yu. Yakubova, O.G. Shulgina.  
Wrote the paper – E.P. Ulianova.  
Edited the manuscript – E.M. Nepomnyashchaya, G.V. Zhukova.

## Литература/References

1. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3233. DOI: 10.3390/ijms21093233.
2. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis.* 2020;11(9):797. DOI: 10.1038/s41419-020-02998-6.
3. Орлова Р.В., Вайзьян Р.И., Иванова А.К., Тихонова Е.К., Зорина Е.Ю. Химиотерапия злокачественных опухолей: проблемы и перспективы. *Вопросы онкологии.* 2015;61(2):244–251. Orlova RV, Vaizyan RI, Ivanova AK, Tikhonova EK, Zorina EYu. Chemotherapy for malignant tumors: problems and prospects. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology.* 2015;61(2):244–251 (In Russ.).
4. Borst P. Looking back at multidrug resistance (MDR) research and ten mistakes to be avoided when writing about ABC transporters in MDR. *FEBS Lett.* 2020;594(23):4001–11. DOI: 10.1002/1873-3468.13972.
5. Garcia-Mayea Y, Mir C, Masson F, Paciucci R, LLeonart ME. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:166–80. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.07.022.
6. Кузин К.А., Фетисов Т.И., Князев Р.И., Фомина Л.Я., Мехеда Л.В., Лесовая Е.А. и др. Определение химиорезистентности клеток рака яичников in vitro. *Успехи молекулярной онкологии.* 2019;6(4):8–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-8-25. Kuzin KA, Fetisov TI, Knyazev RI, Fomina LYa, Mekheda LV, Lesovaya EA et al. Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells in vitro. *Advances in molecular oncology.* 2019;6(4):8–25 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-8-25.
7. Martin-Orozco E, Sanchez-Fernandez A, Ortiz-Parra I, Ayala-San Nicolas M. WNT signaling in tumors: The way to evade drugs and immunity. *Front Immunol.* 2019;10:2854. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02854.
8. Лалетина Л.А., Моисеева Н.И., Климова Д.А., Ставровская А.А. Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе. *Успехи молекулярной онкологии.* 2019;6(1):49–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-49-56. Laletina LA, Moiseeva NI, Klimova DA, Stavrovskaya AA. The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma. *Advances in Molecular Oncology.*

- 2019;6(1):49–56 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-49-56.
9. *Ghandadi M, Valadan R, Mohammadi H, Akhtari J, Khodasheenas S, Ashari S.* Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathway, the achilles' heels of cancer multidrug resistance. *Curr Pharm Des.* 2019;25(39):4192–207. DOI: 10.2174/1381612825666191112142943.
  10. *Gorczyca L, Aleksunes LM.* Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: A review across tissues and species. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020;16(3):239–53. DOI: 10.1080/17425255.2020.1732348.
  11. *Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Владимиров Л.Ю., Ульянова Е.П., Комова Е.А. и др.* Экспрессия p53 и Bcl2 при различных подтипах рака молочной железы. Фундаментальные исследования. 2014;10(1):85–88.  
*Kit OI, Shatova JuS, Novikova IA, Vladimirova LJu, Uljanova EP, Komova EA et al.* P53 and BCL2 expression in different breast cancer subtypes. *Fundamental Research.* 2014;10(1):85–88 (In Russ.).
  12. *Vogell A, Evans ML.* Cancer screening in women. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2019;46(3):485–99. DOI: 10.1016/j.orgc.2019.04.007.
  13. *Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z.* Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(48):84559–71. DOI: 10.18632/oncotarget.19187.
  14. *Nishida S, Tsubaki M.* Exploration of molecular targets in the development of new therapeutics aimed at overcoming multidrug resistance. *Yakugaku Zasshi.* 2017;137(2):145–9. DOI: 10.1248/yakushi.16-00229-5.
  15. *Lage H.* Gene therapeutic approaches to overcome ABCB1-mediated drug resistance. *Recent Results Cancer Res.* 2016;209:87–94. DOI: 10.1007/978-3-319-42934-2\_6.
  16. *Dong Y, Gong L, Lu X, Ye M, Lin Y, Xie S et al.* Changes of transporters and drug-metabolizing enzymes in nephrotic syndrome. *Curr Drug Metab.* 2020;21(5):368–78. DOI: 10.2174/1389200221666200512113731.
  17. *Sun S, Cai J, Yang Q, Zhu Y, Zhao S, Wang Z.* Prognostic value and implication for chemotherapy treatment of ABCB1 in epithelial ovarian cancer: A meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166058. DOI: 10.1371/journal.pone.0166058.
  18. *Savas B, Cole SP, Akoglu TF, Pross HF.* P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and cytotoxic effector cells. *Nat Immun.* 1992;11(4):177–92. PMID: 1358293.
  19. *Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992;258(5088):1650–4. DOI: 10.1126/science.1360704.
  20. *Lim JS, Jung GY, Park SY.* Ncx-2.5 Regulates MDR1 expression via its upstream promoter in breast cancer cells. *J Korean Med Sci.* 2019;34(12):e100. DOI: 10.3346/jkms.2019.34.e100.
  21. *Badmann S, Heublein S, Mayr D, Reischer A, Liao Y, Kolben T et al.* M2 macrophages infiltrating epithelial ovarian cancer express MDR1: A feature that may account for the poor prognosis. *Cells.* 2020;9(5):1224. DOI: 10.3390/cells9051224.
  22. *Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, Litman T.* The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33(6):503–11. DOI: 10.1023/a:1012879205914.
  23. *Nakanishi T, Ross DD.* Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer.* 2012;31(2):73–99. DOI:10.5732/cjc.011.10320.
  24. *Pascal LE, Oudes AJ, Petersen TW, Goo YA, Walashek LS, True LD et al.* Molecular and cellular characterization of ABCG2 in the prostate. *BMC Urol.* 2007;7:6. DOI: 10.1186/1471-2490-7-6.
  25. *Kawahara I, Nishikawa S, Yamamoto A, Kono Y, Fujita T.* The impact of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab Dispos.* 2020;48(6):491–8. DOI: 10.1124/dmd.119.088674.
  26. *Yuan S, Tao F, Zhang X, Zhang Y, Sun X, Wu D.* Role of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in the chemoresistance modulation of colorectal cancer. *Biomed Res Int.* 2020;2020:9390878. DOI: 10.1155/2020/9390878.
  27. *Toyoda Y, Takada T, Suzuki H.* Inhibitors of human ABCG2: From technical background to recent updates with clinical implications. *Front Pharmacol.* 2019;10:208. DOI: 10.3389/fphar.2019.00208.
  28. *Sawangrat K, Yamashita S, Tanaka A, Morishita M, Kusamori K, Katsumi H et al.* Modulation of intestinal transport and absorption of topotecan, a BCRP substrate, by various pharmaceutical excipients and their inhibitory mechanisms of BCRP transporter. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1315–25. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.10.043.
  29. *Świerczewska M, Klejewski A, Brzęt M, Kaźmierczak D, Łycki D, Nowicki M et al.* Newandold genes associated with primary and established responses to paclitaxel treatment in ovarian cancer cell lines. *Molecules.* 2018;23(4):891. DOI: 10.3390/molecules23040891.
  30. *Januchowski R, Sterzyńska K, Zaorska K, Sosińska P, Klejewski A, Brzęt M et al.* Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res.* 2016;9(1):65. DOI: 10.1186/s13048-016-0278-z.

### Информация об авторах

Елена Петровна Ульянова – научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей НМИЦ онкологии Минздрава России.

Евгения Марковна Непомнящая – доктор медицинских наук, профессор, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ онкологии Минздрава России.

Галина Витальевна Жукова – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей НМИЦ онкологии Минздрава России.

Александр Борисович Сагакянц – кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией иммунофенотипирования опухолей НМИЦ онкологии Минздрава России.

Дарья Юрьевна Якубова – аспирант отделения онкогинекологии НМИЦ онкологии Минздрава России.

Оксана Геннадьевна Шульгина – младший научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей НМИЦ онкологии Минздрава России.

### Author Information

Elena P. Ulyanova – Researcher, Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0001-5226-0152>

Evgenia M. Nepomnyashchaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathologist, Pathology Department, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0003-0521-8837>

Galina V. Zhukova – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of the Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0001-8832-8219>

Alexandr B. Sagakyants – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>

Darya Yu. Yakubova – Postgraduate Student, Department of Oncogynecology, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0001-8204-0855>

Oksana G. Shulgina – Junior Researcher, Laboratory of Tumor Immunophenotyping, National Medical Research Centre for Oncology.

<https://orcid.org/0000-0001-6828-145X>

## Уровень протеолитических фрагментов IgG как дополнительный прогностический биомаркер рака предстательной железы

К.А. Артемьева<sup>1</sup>, Е.И. Гоуфман<sup>1</sup>, И.И. Степанова<sup>1</sup>, Н.Б. Тихонова<sup>1</sup>,  
М.Н. Болтовская<sup>1</sup>, Е.А. Пономаренко<sup>1</sup>, И.М. Богданова<sup>1</sup>,  
М.В. Мнихович<sup>1</sup>, Л.М. Михалева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Рак предстательной железы (РПЖ) занимает в мире лидирующие места в структуре онкологической заболеваемости мужчин. Одной из наиболее актуальных проблем является прогнозирование течения РПЖ, что требует совершенствования панели биомаркеров заболевания. Цель исследования – оценить чувствительность, специфичность и прогностическую значимость количественного определения продуктов протеолиза иммуноглобулина G (IgG) в сыворотке крови в зависимости от градации РПЖ по шкале Глисона и связь показателей уровня протеолитических фрагментов IgG с экспрессией онкомаркеров.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 90 мужчин с диагнозом «рак предстательной железы». Степень дифференцировки опухолей оценивали по шкале Глисона. Методом иммуноферментного анализа определяли уровень продуктов протеолиза IgG и общего простатспецифического антигена (prostate-specific antigen, PSA) в сыворотке крови. Проводили иммуногистохимическое исследование с использованием антител к Ki-67, плазминогенсвязывающему белку енолазе-1 (Enolase-1, ENO-1) и простатспецифическому мембранному антигену (prostate-specific membrane antigen, PSMA).

**Результаты.** ROC-анализ продемонстрировал 100% специфичность теста на определение продуктов протеолиза IgG вне зависимости от градации РПЖ по баллам шкалы Глисона, в то время как чувствительность теста составила 72,2%, 57,5%, 52,6% и 46,2% для градаций ISUP 1, 2, 3 и 4, соответственно. Межгрупповое сравнение показало значимые различия между группами пациентов с РПЖ различных градаций по дооперационным уровням PSA и продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови, индексу Ki-67. Выявлена положительная корреляция уровня продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови с экспрессией ENO-1 и отрицательная с количеством баллов по шкале Глисона и экспрессией PSMA. **Заключение.** Дооперационное выявление высокого уровня протеолитических фрагментов IgG в сыворотке крови пациентов с РПЖ даже при низких значениях шкалы Глисона и экспрессии PSMA позволяет прогнозировать более агрессивное течение заболевания и может быть использовано для выбора тактики лечения.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, система активации плазминогена, протеолитические фрагменты иммуноглобулина G, онкомаркеры

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

**Для цитирования:** Артемьева К.А., Гоуфман Е.И., Степанова И.И., Тихонова Н.Б., Болтовская М.Н., Пономаренко Е.А., Богданова И.М., Мнихович М.В., Михалева Л.М. Уровень протеолитических фрагментов IgG как дополнительный прогностический биомаркер рака предстательной железы. Клин. эксп. морфология. 2022;11(2):22–31. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.22-31.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (№ 122012000197-9).

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

Статья поступила 09.07.2021. Получена после рецензирования 28.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

# The level of IgG proteolytic fragments as an additional prognostic biomarker of prostate cancer

K.A. Artemyeva<sup>1</sup>, E.I. Goufman<sup>1</sup>, I.I. Stepanova<sup>1</sup>, N.B. Tikhonova<sup>1</sup>,  
M.N. Boltovskaya<sup>1</sup>, E.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, I.M. Bogdanova<sup>1</sup>,  
M.V. Mnikhovich<sup>1</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

<sup>2</sup> City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Prostate cancer (PC) leads the world structure of male cancer mortality. Understanding the prognosis for PC patients is vitally important and requires diagnostic enhancements such as developing biomarker panels. The study aimed to estimate sensitivity, specificity, and prognostic significance of the level of immunoglobulin G (IgG) proteolysis products in the blood serum depending on PC Gleason score and detect how the levels of IgG proteolytic fragments were associated with the diagnostic marker expression.

**Materials and methods.** The study included 90 PC patients. We used the Gleason score to evaluate tumor grade. The level of the IgG proteolysis products and total prostate-specific antigen (PSA) in the serum was detected with ELISA. We performed an immunohistochemical assay with Ki-67, plasminogen-binding protein enolase-1 (ENO-1), and prostate-specific membrane antigen (PSMA).

**Results.** ROC analysis demonstrated 100% specificity of the IgG proteolysis products test regardless of Gleason score, while the sensitivity reached 72.2%, 57.5%, 52.6%, and 46.2% for ISUP stages 1, 2, 3, and 4, respectively. An intergroup comparison showed significant differences between patient groups according to Gleason score, preoperative PSA and IgG proteolysis product serum levels and Ki-67 index. We detected a positive correlation between the level of IgG proteolysis products in the PC patients' serum and ENO-1 expression and a negative correlation with the Gleason score and PSMA expression.

**Conclusion.** Preoperative detection of high levels of proteolytic IgG fragments in the serum of PC patients even with low Gleason score and PSMA expression may help predict a more aggressive disease course and choose the management strategy.

**Keywords:** prostate cancer, plasminogen activation system, proteolytic fragments of immunoglobulin G, oncomarkers

**Corresponding author:** Ksenia A. Artemyeva. E-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru

**For citation:** Artemyeva K.A., Goufman E.I., Stepanova I.I., Tikhonova N.B., Boltovskaya M.N., Ponomarenko E.A., Bogdanova I.M., Mnikhovich M.V., Mikhaleva L.M. IgG proteolytic fragments level as an additional prognostic biomarker of prostate cancer. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2022;11(2):22–31 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.22-31.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery" (No. 122012000197-9).

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

**Received** 09.07.2021. **Received in revised form** 28.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

## Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) во всем мире занимает лидирующие позиции в структуре онкозаболеваемости и смертности от злокачественных новообразований среди мужчин. В 2020 году в мире было впервые выявлено более 1,4 млн случаев РПЖ, при этом зарегистрировано более 375 тыс. смертельных исходов, связанных с прогрессированием заболевания [1]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России РПЖ занимает 2-е место, что соответствует 14,9% от всех диагностированных злокачественных опухолей, а в группе мужчин старше 60 лет данный показатель увеличивается до 18,4%. Темп ежегодного прироста числа заболевших РПЖ является са-

мым высоким – 87,7% за 10 лет (с 2008 по 2018 год). В 2019 году этот показатель составил 176,3 на 100 тыс. мужчин [2, 3].

РПЖ характеризуется разнообразными клинико-патологическими особенностями, индолентным – медленным, не требующим радикального вмешательства или агрессивным течением заболевания. В клинической практике одной из главных проблем является отбор пациентов для назначения диагностической биопсии, а у пациентов с выявленным РПЖ – дифференциация индолентных новообразований от опухолей с неблагоприятным прогнозом. С учетом этого чрезвычайно важна разработка индивидуализированного подхода для раннего выявления РПЖ и стратификации заболевания (индолентный или агрессивный тип) [4, 5].

Для диагностики и прогнозирования течения заболевания, разделения пациентов на группы риска метастазирования или рецидивирования опухоли широко используются определение простатспецифического антигена (prostate-specific antigen, PSA) в сыворотке крови и оценка биопсийного материала по 10-балльной шкале Глисона либо по новой системе градации на основе шкалы Глисона – группам оценок ISUP, принятой в 2014 году Международным обществом урологической патологии (International Society of Urological Pathology, ISUP) [6]. Скрининг PSA позволяет обнаружить РПЖ на ранней бессимптомной стадии и снизить общую и специфическую для заболевания смертность, однако он имеет низкую прогностическую значимость, поскольку воспаление, инфекция, травма и доброкачественная гиперплазия простаты являются более частыми причинами повышенного уровня PSA в сыворотке, чем рак. Помимо гипердиагностики скрининг увеличивает число пациентов, получающих радикальное лечение при индолентном РПЖ [7].

Несмотря на то, что градация по Глисону считается наиболее значимым прогностическим фактором при локализованном РПЖ, она по своей сути не несет информации о биологических особенностях или генетических изменениях рака. В клинической практике отмечается, что у пациентов одной группы ISUP рак может иметь разную агрессивность, поэтому эксперты полагают, что молекулярные факторы, определяющие течение и исход заболевания, не могут быть выявлены с помощью обычного гистопатологического анализа [4]. В связи с этим в настоящее время проводится интенсивный поиск новых биомаркеров с целью улучшения диагностики и прогноза РПЖ.

Общим свойством злокачественных опухолей является сверхэкспрессия протеолитических ферментов, определяющая их способность к инвазии в прилежащие ткани, метастазированию, усилению ангиогенеза. Важную роль в биологии опухолей играют компоненты системы пламиноген–плазмин. Благодаря широкому диапазону субстратной специфичности плазмин активирует ряд других протеаз, участвующих в деградации белков внеклеточного матрикса. Количественная оценка компонентов системы пламиноген–плазмин в опухолях и в некоторых случаях в периферической крови используется для прогнозирования течения рака внутренних органов, в том числе РПЖ [8]. Агрессивность опухолей во многом определяется протеолитической активностью, поэтому выявление протеаз широко применяется для диагностики и прогноза онкологических заболеваний, разработки новых терапевтических подходов [9].

При этом методы выявления и характеристики протеаз, основанные, как правило, на определении экспрессии мРНК или белка, не дают представления об их активности из-за жесткой посттрансляционной регуляции (синтез в неактивной форме или присутст-

вие в комплексе с эндогенными ингибиторами) [10], поэтому в последнее десятилетие активно разрабатываются новые методологии визуализации и количественной оценки протеазной активности опухолей, основанные на расщеплении пептидных связей различных субстратов, нано- и биосенсоров и выявлении продуктов протеолиза в тканях и биологических жидкостях [10–12].

Один из подходов к определению активности протеаз опухоли основан на способности фрагментов иммуноглобулина G (IgG) со свободным C-концевым лизином, образующихся при протеолизе молекул IgG плазмином, специфически связываться с тяжелой цепью пламиногена. Для количественного определения протеолитических фрагментов IgG в сыворотке крови, уровень которых отражает активность протеолитического каскада пламиноген–плазмин, был разработан оригинальный метод иммуноферментного анализа (ИФА) [13]. С системой пламиноген–плазмин тесно связан гликолитический фермент  $\alpha$ -енолаза (enolase-1, ENO-1), катализирующая внутриклеточное превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват. Помимо ферментативной функции ENO-1, связанная с клеточной мембраной разных типов клеток, в том числе опухолевых, действует как рецептор пламиногена. ENO-1-зависимое образование плазмина, вовлеченного в процессы ремоделирования внеклеточного матрикса и базальной мембраны, способствует инвазии опухолевых клеток в прилежащие ткани и формированию метастазов, поэтому ENO-1 рассматривается как потенциальная мишень для терапии РПЖ [14–16].

Простатспецифический мембранный антиген (prostate-specific membrane antigen, PSMA) также является часто используемым диагностическим маркером РПЖ. Экспрессия PSMA в биоптатах предстательной железы и опухоли, полученной при радикальной простатэктомии (РПЭ), коррелирует с оценкой по шкале Глисона, что демонстрирует его потенциальную прогностическую значимость при проведении диагностической биопсии [17].

Цель исследования – оценить чувствительность, специфичность и прогностическую значимость количественного определения продуктов протеолиза иммуноглобулина G (IgG) в сыворотке крови в зависимости от градации РПЖ по шкале Глисона и связь показателей уровня протеолитических фрагментов IgG с экспрессией онкомаркеров.

## Материалы и методы

### *Характеристика пациентов с РПЖ*

В исследование были включены 90 мужчин в возрасте от 51 года до 77 лет (медиана возраста – 63 года), у которых в 2019 году установлен диагноз аденокарциномы предстательной железы T2c–T3aN0M0-x и проведена РПЭ (табл. 1).



Таблица 1 | Table 1

**Характеристики пациентов с раком предстательной железы |  
Characteristics of prostate cancer patients**

Показатель   Parameter	Значение   Value
Медиана возраста (диапазон), лет   Median age (range), years	63 (51–77)
Медиана дооперационного уровня простатического специфического антигена (диапазон), нг/мл   Median of baseline level of prostate-specific antigen (range), ng/mL	7,06 (0,18–30,31)
Клиническая стадия, n (%):   Clinical stage, n (%):	
cT1a–c	0 (0)
cT2a–b	0 (0)
cT2c	59 (65,56)
cT3a	17 (18,89)
cT3b	14 (15,56)
cT4	0 (0)
Сумма баллов по шкале Глисона, n (%):   Gleason score, n (%):	
6 (3+3) (ISUP 1)	18 (20,0)
7 (3+4) (ISUP 2)	40 (44,44)
7 (4+3) (ISUP 3)	19 (21,11)
8 (4+4, или 5+3, или 3+5) (ISUP 4)   8 (4+4, or 5+3, or 3+5) (ISUP 4)	10 (11,11)
9–10 (ISUP 5)	3 (3,33)

### Морфологические методы

На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивали степень дифференцировки опухолей по шкале Глисона. Для проведения иммуногистохимического (ИГХ) исследования антигены демаскировали путем кипячения срезов в цитратном буфере (pH 6,0) 30 минут (Dako, Дания). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в течение 5 минут с 3% перекисью водорода, затем с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина при температуре +18–20°C для блокирования неспецифического связывания антител. Экспозицию с первичными антителами (Abcam, Великобритания) в разведении 1:100 (кроличьи поликлональные анти-Ki67 ab15580, рекомбинантные анти-ENO1 (EPR19758) ab227978, рекомбинантные анти-PSMA (EPR6253) ab133579) проводили при +4°C в течение 24 часов. Для визуализации ИГХ реакции использовали набор Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen (Thermo Scientific, США). По окончании инкубации с антителами срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Морфометрическое исследование выполняли с использованием светового микроскопа Leica DM 2500, оснащенного цифровой фотокамерой, при помощи графического планшета и программы ImageScoreM (Leica Microsystems GmbH, Германия) при  $\times 200$  в 10 полях зрения. Уровни экспрессии ENO-1 и PSMA определяли полуколичественно, оценивая интенсивность окрашивания в баллах: 0 (нет окрашивания), 1 (слабое окрашивание), 2 (умеренное окрашивание) и 3 (выраженное

окрашивание). Подсчитывали количество Ki-67<sup>+</sup> клеток на 100 клеток в очагах опухоли (индекс Ki-67).

### Биохимические методы

В сыворотке крови, полученной от 90 пациентов с установленным диагнозом «рак предстательной железы», определяли уровень продуктов протеолиза IgG человека методом ИФА с применением тест-системы «АнтиПлазминоген-ИФА» («Ангиоген», Россия). Результаты представляли в единицах оптической плотности (ОП). Концентрацию общего PSA измеряли методом ИФА с использованием тест-системы PSA (Total) KLIK3 ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контроля использовали сыворотку крови 30 здоровых мужчин в возрасте 30–45 лет. На проведение исследования было получено информированное согласие принимавших в нем участие пациентов и доноров.

### Статистические методы

Данные проанализированы с помощью программ Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США) и MS Office Excel с применением надстройки Attestat. Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Применяли метод множественных сравнений One-Way ANOVA с поправкой Холма–Сидака–Бонферрони, корреляционный анализ для оценки взаимосвязи признаков с использованием критерия Спирмена (r). Для определения чувствительности и специфичности теста «АнтиПлазминоген-ИФА» проводили ROC-анализ с

оценкой прогностической значимости (AUC), исходя из отсутствия/наличия РПЖ и градации опухоли по шкале Глисона. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия и корреляцию считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

ROC-анализ выявил 100% специфичность теста «АнтиПлазминоген-ИФА» независимо от группы оценок ISUP. При этом чувствительность составила 72,2%, 57,5%, 52,6% и 46,2%, а прогностическая значимость – 0,78, 0,78, 0,76 и 0,65 для градаций ISUP 1, 2, 3 и 4, соответственно (рис. 1).

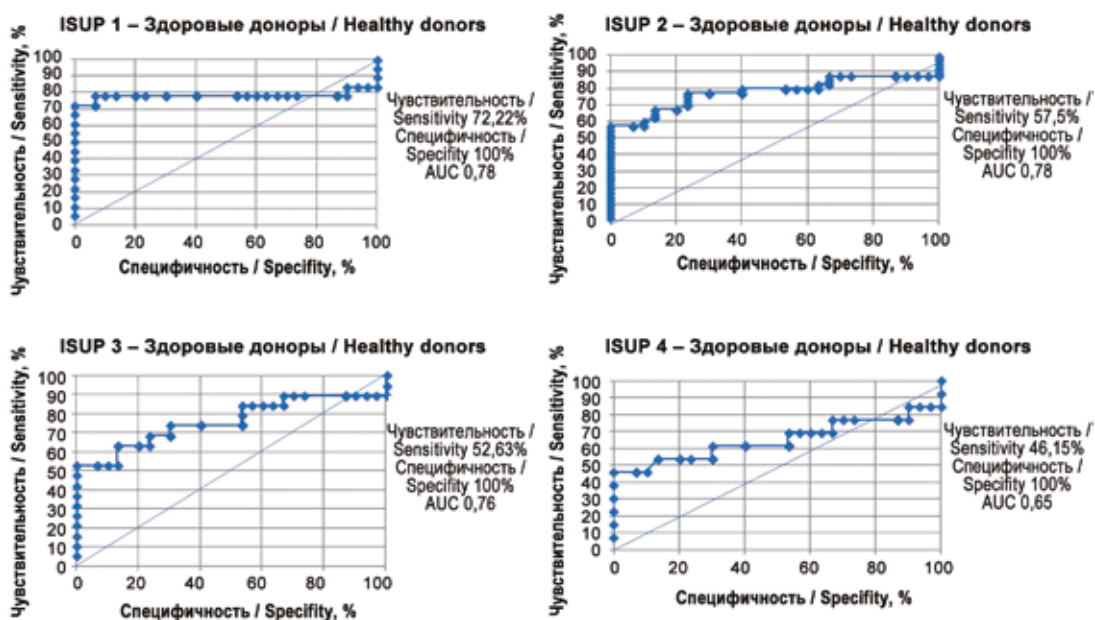


Рис. 1. ROC-анализ показателей оптической плотности в ИФА фрагментов протеолиза IgG в сыворотке крови пациентов с РПЖ на стадиях ISUP 1–4 (n=90) и здоровых доноров (n=30)

Fig. 1. ROC analysis of optic density (OD) values in ELISA of proteolytic fragments of IgG for serum samples from PC patients at different stages ISUP 1–4 (n=90) and healthy donors (n=30)

Таблица 2 | Table 2

Межгрупповые различия уровней продуктов протеолиза IgG (оптическая плотность, ОП), PSA и индекса Ki-67 | Intergroup differences in the levels of IgG proteolytic products (optical density, OD), PSA, and Ki-67 index

Группы   Groups	Продукты протеолиза IgG, ОП   IgG proteolytic products, OD Me (Q1; Q3)	PSA, нг/мл   PSA, ng/mL Me (Q1; Q3)	Индекс Ki-67   Ki-67 index Me (Q1; Q3)
Глисон 6   Gleason 6 (n=18)	0,749 (0,482; 1,566)	6,28 (4,65; 8,16)	12 (11,7; 12,55)
Глисон 7   Gleason 7 (n=59)	0,604 (0,389; 1,516)	7,71 (5,23; 10,65)	16,2 (12,4; 24,5)
Глисон 8, 9   Gleason 8, 9 (n=13)	0,450 (0,315; 0,9)	9,48 (3,94; 21,49)	26,1 (23,55; 28,05)
Межгрупповые различия (множественное сравнение)   Intergroup differences (multiple comparison)	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,0004$

Межгрупповое сравнение показало значимые различия в группах пациентов с РПЖ разной градации по дооперационным уровням продуктов протеолиза IgG и PSA в сыворотке крови, индексам Ki-67 (табл. 2).

В результате проведения корреляционного анализа установлено, что уровень продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови имеет значимую отрицательную связь с баллами шкалы Глисона и экспрессией PSMA, значимую положительную связь с экспрессией ENO-1 и не коррелирует с показателями концентрации PSA.

Сывороточный уровень PSA положительно коррелировал с числом баллов по шкале Глисона и экспрессией ENO-1. Индекс Ki-67 положительно коррелиро-

вал с баллами по шкале Глисона и экспрессией ENO-1 (табл. 3).

ИГХ исследование РПЖ выявило индивидуальную вариабельность экспрессии онкомаркеров ENO-1,

Ki-67, PSMA. Репрезентативные результаты представлены на рисунках 2–4, соответствующие индивидуальные биохимические и клинические показатели – в таблице 4.

Таблица 3 | Table 3

**Корреляция биохимических и иммуногистохимических маркеров рака предстательной железы |  
Correlation of biochemical and immunohistochemical prostate cancer markers**

Сравниваемые показатели   Compared indicators	Продукты протеолиза IgG   Proteolytic products of IgG	PSA	Ki-67
Баллы по шкале Глисона   Gleason score	$r = -0,23$ , $p = 0,037$ ДИ 95%   CI 95% (-0,42; -0,014)	$r = 0,29$ , $p = 0,009$ ДИ 95%   CI 95% (0,08; 0,48)	$r = 0,43$ , $p = 0,048$ ДИ 95%   CI 95% (0,01; 0,72)
PSMA	$r = -0,37$ , $p = 0,05$ ДИ 95%   CI 95% (-0,653; 0,003)	$r = 0,15$ , $p = 0,61$ ДИ 95%   CI 95% (-0,41; 0,63)	$r = 0,31$ , $p = 0,39$ ДИ 95%   CI 95% (-0,4; 0,79)
ENO-1	$r = 0,6$ , $p = 0,024$ ДИ 95%   CI 95% (0,1; 0,86)	$r = 0,74$ , $p = 0,003$ ДИ 95%   CI 95% (0,34; 0,91)	$r = 0,83$ , $p = 0,003$ ДИ 95%   CI 95% (0,41; 0,96)
PSA	$r = 0,1$ , $p = 0,939$ ДИ 95%   CI 95% (0,04; 0,32)		$r = -0,2$ , $p = 0,56$ ДИ 95%   CI 95% (-0,71; 0,46)

ДИ – доверительный интервал | CI – confidence interval

Таблица 4 | Table 4

**Индивидуальные биохимические и клинические показатели пациентов |  
Individual biochemical and clinical parameters of patients**

№   No.	PSA, нг/л   PSA, ng/L	Продукты протеолиза IgG, ОП   IgG proteolytic products, OD	TNM	Баллы по шкале Глисона   Gleason score
1	9,59	0,321	T2cN0M0	7 (3+4)
2	3,11	1,553	T2N0Mx	7 (4+3)
3	16,83	1,851	T3N1M0	7 (3+4)

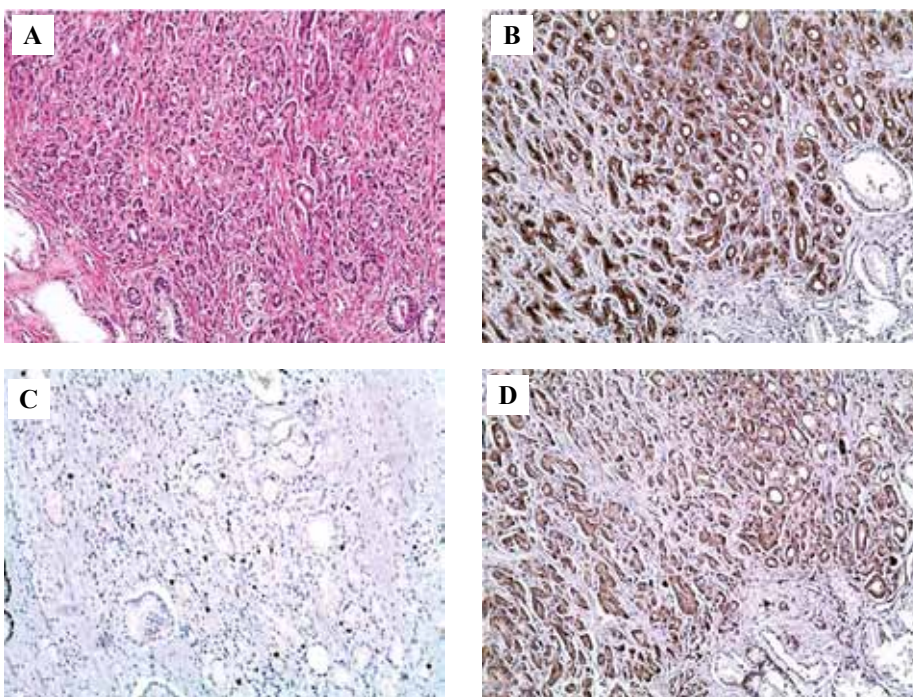


Рис. 2. Пациент 1.  
А – окрашивание гематоксилином и эозином, В, С, D – экспрессия ИГХ маркеров: В – PSMA, С – Ki-67, D – ENO-1,  $\times 100$

Fig. 2. Patient 1.  
A – H&E stain, B, C, D – expression of IHC markers: B – PSMA, C – Ki-67, D – ENO-1,  $\times 100$

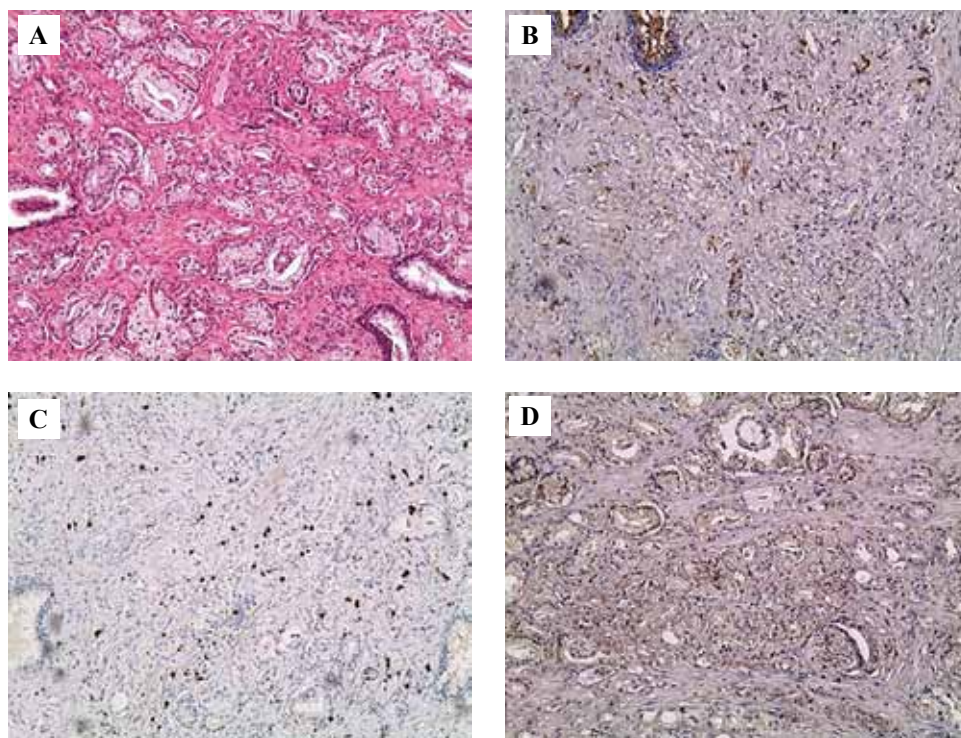


Рис. 3. Пациент 2.

А – окрашивание гематоксилином и эозином,  
В, С, D – экспрессия ИГХ маркеров:  
В – PSMA, С – Ki-67,  
D – ENO-1,  $\times 100$

Fig. 3. Patient 2.

А – H&E stain,  
В, С, D – expression of IHC markers:  
В – PSMA, С – Ki-67,  
D – ENO-1,  $\times 100$

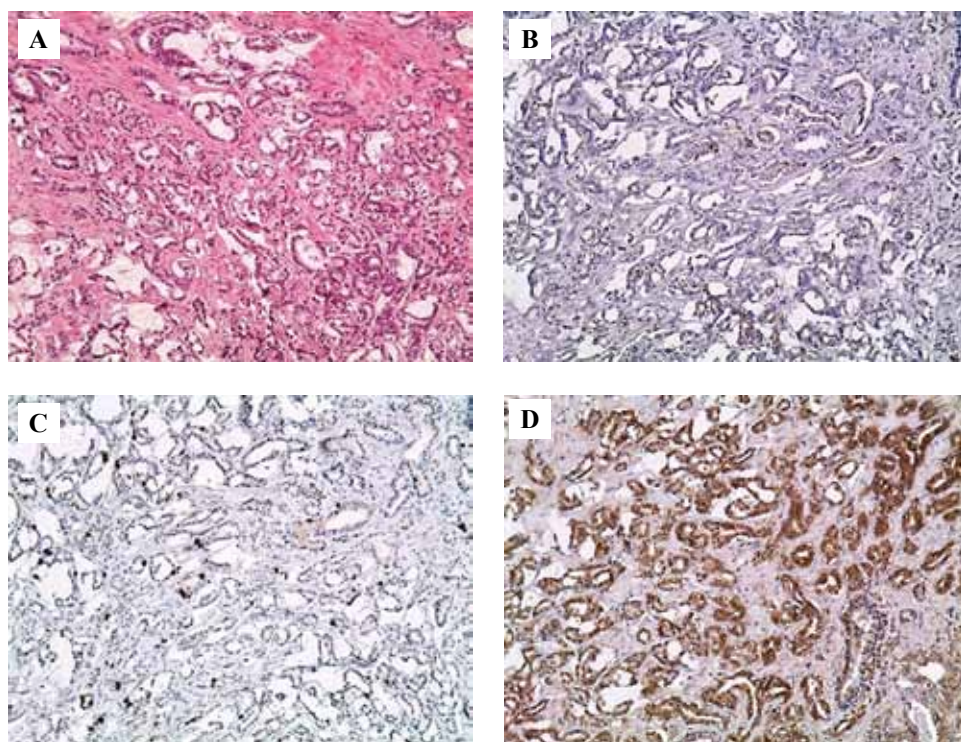


Рис. 4. Пациент 3.

А – окрашивание гематоксилином и эозином,  
В, С, D – экспрессия ИГХ маркеров:  
В – PSMA, С – Ki-67,  
D – ENO-1,  $\times 100$

Fig. 4. Patient 3. A – H&E stain,

В, С, D – expression of IHC markers:  
В – PSMA, С – Ki-67,  
D – ENO-1,  $\times 100$

## Обсуждение

РПЖ редко проявляется на ранней стадии, различается клинико-патологическими особенностями и характером течения, поэтому очень важна разработка персонализированного подхода для раннего выявления и стратификации заболевания (индолентная или агрессивная форма рака) [18]. Улучшение прогноза заболевания на момент постановки первичного диагноза

диктует необходимость поиска дополнительных критериев. Учитывая зависимость характера течения заболевания от протеолитической активности опухолей [9], мы оценили значимость определения протеолитических фрагментов IgG как потенциальных прогностических биомаркеров РПЖ во взаимосвязи с маркерами, используемыми в клинической практике. Выбор IgG как субстрата протеолиза плазмином был обусловлен

данными о наличии депозитов IgG в РПЖ [19], продукции IgG неидентифицированной специфичности клетками злокачественных эпителиальных опухолей и роли опухолевых IgG в развитии и прогрессии рака, в том числе РПЖ [20–22].

Результаты ROC-анализа показали 100% специфичность ИФА, определяющего уровень фрагментов IgG в сыворотке крови, независимо от группы оценки ISUP. При этом максимальная чувствительность (72,2%) была отмечена для группы 1 (6 баллов по шкале Глисона), по мере увеличения градации ISUP чувствительность теста уменьшалась. Прогностическая значимость была практически одинаково высокой (около 80%) для групп 1, 2, 3 – баллы по шкале Глисона 6 (3+3), 7 (3+4), 7 (4+3) и снижалась (65%) для группы 4 (балл по шкале Глисона 8). Медиана уровней протеолитических фрагментов IgG значимо уменьшалась при возрастании градации РПЖ, корреляционный анализ подтвердил отрицательную взаимосвязь этих показателей.

Иммуногистохимические методы исследования позволяют выявить индивидуальные характеристики опухоли, определяющие их потенциал роста и метастазирования, что способствует выбору оптимальной стратегии и тактики лечения [23]. Положительная корреляция уровня продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови с экспрессией ENO-1, участвующей в генерации плазмينا [16], и отсутствие корреляции с концентрацией PSA в сыворотке крови позволяют рассматривать показатель уровня протеолитических фрагментов IgG как независимый биомаркер, отражающий протеазную активность опухоли на ранних, клинически не проявляющихся стадиях РПЖ. Экспрессия ENO-1, положительно коррелирующая с уровнем продуктов протеолиза IgG, подтверждает активное участие системы пламиноген–плазмин во фрагментации локализованных в зоне опухоли иммуноглобулинов. В свою очередь, это объясняет положительную корреляцию между уровнем экспрессии ENO-1 и сывороточными показателями PSA, отражающими степень повреждения тканей предстательной железы.

По данным A. Cimidamore et al., существует сильная положительная корреляция между экспрессией PSMA и градацией РПЖ по шкале Глисона [24]. Нами установлена отрицательная связь показателей уровня продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови с баллами по шкале Глисона и экспрессией PSMA. Следовательно, высокий уровень протеолитических фрагментов IgG на момент постановки диагноза имеет прогностический потенциал для дифференциации индолентного и агрессивного заболевания и последующей стратификации пациентов на группы риска на ранних стадиях РПЖ, характеризующихся низкой экспрессией PSMA.

Полученные данные о положительной корреляционной связи баллов по шкале Глисона с дооперационным

уровнем PSA и индексом Ki-67 согласуются с результатами проведенных ранее исследований [25, 26].

## Заключение

Максимальная чувствительность, специфичность и прогностическая значимость количественного определения протеолитических фрагментов IgG в сыворотке крови при малых значениях шкалы Глисона (6 баллов, группа 1 ISUP), положительная корреляция показателей уровня фрагментов IgG с экспрессией ENO-1, участвующей в генерации плазмينا, и отрицательная корреляция с экспрессией PSMA свидетельствуют о практической значимости количественной оценки продуктов протеолиза на ранних стадиях РПЖ. Полученные результаты могут быть использованы для прогнозирования течения РПЖ на момент постановки первоначального диагноза. Так, дооперационное выявление высокого уровня протеолитических фрагментов IgG – системных маркеров, связанных с локальной активностью протеаз опухоли, даже при небольших баллах по шкале Глисона и низкой экспрессии PSMA позволяет прогнозировать более агрессивное течение заболевания и оптимизировать выбор тактики лечения. Включение теста на определение продуктов протеолиза IgG в сыворотке крови пациентов с РПЖ в многопараметрическую прогностическую модель способно повысить ее эффективность.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.А. Артемьева, Е.И. Гоуфман.

Сбор и обработка материала – Е.И. Гоуфман, К.А. Артемьева, И.И. Степанова, Н.Б. Тихонова, Е.А. Пономаренко.

Написание текста – К.А. Артемьева, Н.Б. Тихонова, М.В. Мнихович.

Редактирование – Л.М. Михалева, М.Н. Болтовская, И.М. Богданова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – К.А. Artemyeva, E.I. Goufman.

Collected the data and performed the analysis – E.I. Goufman, K.A. Artemyeva, I.I. Stepanova, N.B. Tikhonova, E.A. Ponomarenko.

Wrote the paper – К.А. Artemyeva, N.B. Tikhonova, M.V. Mnikhovich.

Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, M.N. Boltovskaya, I.M. Bogdanova.

## Литература/References

1. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2020. 239 с.

- AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2019. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020. 239 p. (In Russ.).
3. Алексеев Б.Я., Крашенинников А.А., Нюшко К.М., Воробьев Н.В., Каприн А.Д. Хирургическое лечение больных раком предстательной железы с высоким риском прогрессирования: отдаленные онкологические результаты и факторы прогноза. Онкоурология. 2020;16(4):99–111. DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-4-99-111. *Alekseev BYa, Krasheninnikov AA, Nyushko KM, Vorobyev NV, Kaprin AD.* Surgical treatment of patients with high-risk prostate cancer: Long-term outcomes and prognostic factors. *Cancer Urology.* 2020;16(4):99–111 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-4-99-111.
  4. Carneiro A, Priante Kayano P, Gomes Barbosa AR, Langer Wroclawski M, Ko Chen C, Cavlini GC et al. Are localized prostate cancer biomarkers useful in the clinical practice? *Tumour Biol.* 2018;40(9):1010428318799255. DOI: 10.1177/1010428318799255.
  5. Koha I, Petrovics G, Srivastava S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1813. DOI: 10.3390/ijm20081813.
  6. Sopyllo K, Erickson AM, Mirtti T. Grading evolution and contemporary prognostic biomarkers of clinically significant prostate cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(4):628. DOI: 10.3390/cancers13040628].
  7. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: A systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018;362:k3519. DOI: 10.1136/bmj.k3519.
  8. McMahon BJ, Kwaan H. Components of the plasminogen-plasmin system as biological markers for cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:145–56. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0\_10.
  9. Wyganowska-Świątkowska M, Tarnowski M, Murtagh D, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review). *Int J Mol Med.* 2019;43(1):15–25. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3983.
  10. Vasiljeva O, Menendez E, Nguyen M, Craik CS, Michael Kavanaugh W. Monitoring protease activity in biological tissues using antibody prodrugs as sensing probes. *Sci Rep.* 2020;10(1):5894. DOI: 10.1038/s41598-020-62339-7.
  11. Dudani JS, Ibrahim M, Kirkpatrick J, Warren AD, Bhatia SN. Classification of prostate cancer using a protease activity nanosensor library. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(36):8954–9. DOI: 10.1073/pnas.1805337115.
  12. Vizovisek M, Ristanovic D, Menghini S, Christiansen MG, Schuerle S. The tumor proteolytic landscape: A challenging frontier in cancer diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2514. DOI: 10.3390/ijms22052514.
  13. Goufman IE, Yakovlev VN, Tikhonova NB, Matevosyan KS, Boltovskaya MN, Aisina RB et al. Increased blood concentration of IgG degradation products in prostate cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2019;166(5):651–5. DOI: 10.1007/s10517-019-04411-5.
  14. Wang L, Qu M, Huang S, Fu Y, Yang L, He S et al. A novel  $\alpha$ -enolase-targeted drug delivery system for high efficacy prostate cancer therapy. *Nanoscale.* 2018;10(28):13673–83. DOI: 10.1039/c8nr03297a.
  15. Didiasova M, Schaefer L, Wygrecka M. When place matters: Shuttling of enolase-1 across cellular compartments. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:61. DOI: 10.3389/fcell.2019.00061.
  16. Almaguel FA, Sanchez TW, Ortiz-Hernandez GL, Casiano CA. Alpha-enolase: Emerging tumor-associated antigen, cancer biomarker, and oncotherapeutic target. *Front Genet.* 2021;11:614726. DOI: 10.3389/fgene.2020.614726.
  17. Hupe MC, Philippi C, Roth D, Kumpers C, Ribbat-Idel J, Becker F et al. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA) on biopsies is an independent risk stratifier of prostate cancer patients at time of initial diagnosis. *Front Oncol.* 2018;8:623. DOI: 10.3389/fonc.2018.00623.
  18. Kohaar I, Petrovics G, Srivastava SA. Rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1813. DOI: 10.3390/ijms20081813.
  19. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(1):24–37. DOI: 10.1038/nrc1782.
  20. Qin C, Sheng Z, Huang X, Tang J, Liu Y, Xu T et al. Cancer-driven IgG promotes the development of prostate cancer through the SOX2-C1gG pathway. *Prostate.* 2020;80(13):1134–44. DOI: 10.1002/pros.24042.
  21. Kdimati S, Mullins CS, Linnebacher M. Cancer-cell-derived IgG and its potential role in tumor development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11597. DOI: 10.3390/ijms222111597.
  22. Zhao J, Peng H, Gao J, Nong A, Hua H, Yang S et al. Current insights into the expression and functions of tumor-derived immunoglobulins. *Cell Death Discov.* 2021;7(1):148. DOI: 10.1038/s41420-021-00550-9.
  23. Швороб Д.С., Шевченко Т.И., Кондратьюк Р.Б. Диагностика молекулярно-генетических подтипов колоректального рака с использованием иммуногистохимических методов исследования. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(3):14–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.14-20. *Shvorob DS, Shevchenko TI, Kondratyuk RB.* Diagnosis of molecular subtypes of colorectal cancer using immunohistochemistry. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(3):14–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.14-20 (In Russ.).
  24. Cimadamore A, Cheng M, Santoni M, Lopez-Beltran A, Battelli N, Massari F et al. New prostate cancer targets for diagnosis, imaging, and therapy: Focus on prostate-specific membrane antigen. *Front Oncol.* 2018;8:653. DOI: 10.3389/fonc.2018.00653.
  25. Геворкян А.П., Авакян А.Ю., Ефремов Е.А., Симаков В.В. Корреляция между степенью Глисона и значением простатспецифического антигена. Экспериментальная и клиническая урология. 2014;3:37–39. *Gevorkyan AR, Avakyan AYu, Efremov EA, Simakov VV.* Correlation between Gleason score and PSA level. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology.* 2014;3:37–39 (In Russ.).

26. Пульбере С.А., Бабиченко И.И., Котов С.В., Гуспанов Р.И. Применение иммуногистохимических методов исследования в диагностике рака предстательной железы. Вестник урологии. 2017;5(3):30–38. DOI: 10.21886/2308-6424-2017-5-3-30-38.
- Pulbere SA, Babichenko II, Kotov SV, Guspanov RI. Application immunohistochemically research methods in the diagnosis of prostate cancer. Vestnik Urologii = Urology Herald. 2017;5(3):30–38 (In Russ.). DOI: 10.21886/2306-6424-2017-5-3-30-38.*

### Информация об авторах

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Евгений Иосифович Гоуфман – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Ирина Ильдаровна Степанова – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Наталья Борисовна Тихонова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Марина Николаевна Болтовская – доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Ирина Марковна Богданова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Максим Валерьевич Мнихович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31.

### Author information

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Eugene I. Goufman – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-7468-7015>

Irina I. Stepanova – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Natalya B. Tikhonova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-5437-6933>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>

Irina M. Bogdanova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Maksim V. Mnikhovich – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Central Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>

Lyudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Head of the Pathology Department, City Clinical Hospital No. 31.  
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

## Особенности накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, М.А. Резцова, Е.А. Овчаренко

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

**Резюме.** *Введение.* Ксенобиопротезы клапанов сердца подвержены развитию структурной дегенерации их биологического компонента. Этот процесс сопровождается отложением липидов крови в биоматериале. Ранее было выдвинуто предположение, что липидная инсудация створчатого аппарата ксенобиопротезов вторична к клеточной инфильтрации, а за удержание липидов в ксеноткани ответственны продуцируемые клетками реципиента гликозаминогликаны. Целями настоящей работы стали изучение закономерностей накопления липидов в створчатом аппарате имплантатов, а также проверка гипотезы об участии клеток и гликозаминогликанов в этом процессе.

*Материалы и методы.* Материалом для исследования послужили 10 ксенобиопротезов (пять ксеноаортальных и пять ксеноперикардиальных), эксплантированных из митральной позиции при репротезировании. Створки полученных образцов отделяли от каркаса и замораживали для подготовки срезов на криотоме. С целью изучения клеточной инфильтрации, а также выявления дегенеративных изменений в протезном биоматериале срезы окрашивали гематоксилином Джилла и эозином. Для анализа компонентного состава створок и визуализации липидных пятен применяли окрашивание пентахромом по Мовату и масляным красным, соответственно. Анализ окрашенных срезов осуществляли методом световой микроскопии.

*Результаты.* В створках всех изученных ксеноаортальных биопротезов присутствовали крупные липидные пятна и скопления пенистых клеток, однако таковые не были обнаружены в створках ксеноперикардиальных имплантатов. Отложения липидов и клеточные инфильтраты, как правило, не локализовались совместно друг с другом. Окрашивание пентахромом по Мовату показало отсутствие гликозаминогликанов в створках ксенобиопротезов обоого типа.

*Заключение.* Интенсивность липидной инсудации в створчатый аппарат ксенобиопротезов зависит от типа биоматериала, из которого он изготовлен. Накоплению липидов крови подвержены створки ксеноаортальных, но не ксеноперикардиальных биопротезов. Присутствие клеточных инфильтратов и гликозаминогликанов в створках не является определяющим фактором, способствующим накоплению липидов.

**Ключевые слова:** биопротезы клапанов сердца, структурная дегенерация клапана, клеточная инфильтрация, липиды крови, гликозаминогликаны

**Для корреспонденции:** Александр Евгеньевич Костюнин. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

**Для цитирования:** Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Богданов Л.А., Резцова М.А., Овчаренко Е.А. Особенности накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца. Клин. эксп. морфология. 2022;11(2):32–42. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.32-42.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-10107.

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

Статья поступила 25.10.2021. Получена после рецензирования 29.11.2021. Принята в печать 16.12.2021.

## Lipid accumulation features in the heart valve epoxy-treated xenograft

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, М.А. Резцова, Е.А. Овчаренко

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Xenograft heart valves are prone to structural valve degeneration accompanied by lipid accumulation. Research data suggest that the lipid insudation of bioprosthetic valve is secondary



to cellular infiltration, since glycosaminoglycans produced by the recipient's cells are responsible for the lipid storage in the xenograft tissue. The objective of this research was to study the mechanisms of lipid accumulation in the heart valve xenograft, and to test the hypothesis that cells and glycosaminoglycans play a role in this process.

*Materials and methods.* The study included 10 explanted bioprosthetic mitral valves (5 xenoaortic and 5 xenopericardial). We separated the leaflets of these valves from the stent, then the material was frozen and transferred to the cryotome for section preparation. The sections were stained with Gill's H&E staining in order to study the cellular infiltration and detect any degenerative changes. To analyze the component composition of the leaflets the sections were stained with Movat's pentachrome, whereas Oil Red O was used to visualize the lipids. We used light microscopy to analyze the stained samples.

*Results.* Lipids and clusters of foam cells were present in all xenoaortic heart valves, but they were not found in the xenopericardial heart valves. Most lipid deposits and cellular infiltrates were not colocalized. Movat's pentachrome staining revealed an absence of glycosaminoglycans in the leaflets of both types of bioprostheses.

*Conclusion.* The intensity of lipid insudation in the leaflets of bioprosthetic heart valves depends on the xenograft biomaterial. Xenoaortic bioprosthetic heart valves are revealed to be prone to lipid accumulation, unlike xenopericardial bioprostheses. The presence of cell infiltration and glycosaminoglycans in the leaflets is not a determining factor contributing to the accumulation of lipids.

**Keywords:** bioprosthetic heart valves, structural valve degeneration, cell infiltration, blood lipids, glycosaminoglycans

**Corresponding author:** Alexander E. Kostyunin. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

**For citation:** Kostyunin A.E., Glushkova T.V., Bogdanov L.A., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A. Lipid accumulation features in the heart valve epoxy-treated xenograft. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):32–42 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.32-42.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-75-10107.

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

**Received** 25.10.2021. **Received in revised form** 29.11.2021. **Accepted** 16.12.2021.

## Введение

В современной хирургии для замены несостоятельных нативных клапанов сердца чаще всего используют механические и ксеногенные биологические протезы, изготавливаемые из искусственных материалов или химически стабилизированных тканей животных, соответственно [1]. Последние выгодно отличаются от своих механических аналогов низкой тромбогенностью, но они менее долговечны [2]. До 30% ксенобиопротезов требует замены из-за развития дисфункций уже через 10 лет после имплантации [3]. Основной причиной несостоятельности имплантатов этого типа является структурная дегенерация ксеноткани, из которой изготовлен створчатый аппарат [4, 5]. Эта особенность существенно ограничивает возможности применения ксенобиопротезов у пациентов моложе 65 лет [6, 7].

Согласно современным представлениям, механизмы, стоящие за структурной дегенерацией ксенобиопротезов, включают хроническое иммунное отторжение, для которого характерны некоторые черты, свойственные атеросклеротическому поражению сосудов и минерализации нативных клапанов аорты [1]. Так, результаты оригинальных исследований демонстрируют, что в створках ксенобиопротезов, удаленных вследствие дисфункций, присутствуют значительные отложения липидов, которые локализуются совместно

с инфильтратами макрофагов и пенистых клеток [8, 9]. При этом липиды стимулируют секрецию иммунными клетками матриксных металлопротеиназ, которые, в свою очередь, способны расщеплять основные склеропротеины ксеноткани и приводить к ухудшению ее прочностных свойств [9]. Также липиды крови переносят ряд ферментов, таких как липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2. Хотя о влиянии данного соединения на протезную ксеноткань пока ничего неизвестно, повышенные уровни этого фермента в крови положительно коррелируют с более быстрыми темпами структурной дегенерации и ухудшением гемодинамических параметров биопротезов [10, 11]. Наконец, липиды крови могут участвовать в окислительно обусловленной дегенерации биоматериала и выступать в качестве ядер кальцификации [8]. В совокупности накопленные к настоящему моменту данные позволяют считать отложение липидов в створках ксенобиопротезов одним из факторов, способных ускорять протеолитическую, окислительную и кальциевую деградацию протезного биоматериала.

Несмотря на потенциально важную роль липидов крови в дегенерации створчатого аппарата ксенобиопротезов, механизмы липидной инсудации в ксеноткань изучены слабо. Основываясь на собственных оригинальных данных, Р. Шетти (R. Shetty) с соавторами высказали предположение, согласно которому

за удержание липидов в протезных створках могут отвечать продуцируемые макрофагами гликозаминогликаны [9]. Впрочем, эта гипотеза не была проверена на примере эпоксиобработанных биопротезов, производимых в России ЗАО «НеоКор» (Кемерово). Последние отличаются от зарубежных аналогов тем, что для стабилизации ксенотканей при их изготовлении вместо глутарового альдегида используют диглицидиловый эфир этиленгликоля [12, 13]. Кроме того, до сих пор оставалось неясным, зависит ли интенсивность липидной инсудации от типа ткани, из которой изготовлен створчатый аппарат ксенобиопротезов: аортального комплекса свиньи или перикарда крупного рогатого скота [14].

Таким образом, целями настоящей работы стали изучение закономерностей накопления липидов в створках эпоксиобработанных биопротезов разного типа – ксеноаортальных и ксеноперикардиальных, а также проверка гипотезы об участии клеток реципиента и гликозаминогликанов в этом процессе.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили 10 ксенобиопротезов, эксплантированных из митральной позиции в ходе репротезирования. Среди изученных образцов были ксеноаортальные протезы моделей «КемКор» (n=2) и «ПериКор» (n=3), а также ксеноперикардиальные протезы модели «ЮниЛайн» (n=5) производства ЗАО «НеоКор» (Кемерово, Россия). Средний возраст реципиентов ксеноаортальных биопротезов на момент репротезирования составил  $61,4 \pm 10,2$  года, ксеноперикардиальных –  $63,0 \pm 14,8$  года. Средний срок функционирования имплантатов первого и второго типа достигал  $158,4 \pm 20,9$  и  $57,0 \pm 23,2$  месяца, соответственно. Только один реципиент ксеноаортального биопротеза страдал дислипидемией.

После иссечения ксенобиопротезы помещали в 0,9% раствор натрия хлорида и доставляли в лабораторию, где проводили макроскопический анализ дегенеративных изменений биологического материала с последующей подготовкой образцов для гистологического исследования. Створки полученных биопротезов отделяли от каркаса, фиксировали в криогеле Neg-50 (Thermo Scientific, Германия) и с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия) проводили подготовку серийных срезов толщиной  $6 \pm 1$  мкм. Готовые срезы размещали на предметных стеклах по 4–5 штук. Для изготовления срезов брали центральную часть каждой из трех створок ксенобиопротеза от основания до свободного края, а также участки с дегенеративными изменениями – разрывами, утолщением и кальцификацией биоматериала, выявленными макроскопически.

Для изучения локализации клеточных элементов и выявления степени дегенеративных изменений протезного ксенобиоматериала использовали окрашивание гематоксилином Джилла («БиоВитрум», Россия)

и эозином («БиоВитрум», Россия) по протоколу, который был оптимизирован ранее для элементов системы кровообращения [15]. Компонентный состав тканей створок и присутствие липидов определяли с помощью наборов для пентахромного окрашивания по Мовату (Abscam, Великобритания) и окрашивания масляным красным (Abscam, Великобритания), соответственно. Указанные окрашивания выполняли по протоколам производителя. В качестве контроля использовали интактные створки неимплантированных ксеноаортального и ксеноперикардиального биопротезов («НеоКор», Кемерово). Анализ окрашенных образцов осуществляли посредством микроскопа AxioImager.A1 (Zeiss, Германия), обработку изображений проводили с помощью программы AxioVision (Zeiss, Германия). Результаты оценивали два гистолога независимо друг от друга.

Исследование проводили в соответствии с принципами Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № 19 от 06.11.2018). Все пациенты подписали письменное информированное согласие после разъяснения сути исследования.

## Результаты

Макроскопическое изучение эксплантированных ксенобиопротезов показало, что створки всех полученных образцов характеризовались утолщением ксеноткани. Для створок ксеноаортальных биопротезов отмечены перфорации и разрывы, локализованные преимущественно в областях коаптации и комиссур. Также мы наблюдали умеренное разрастание соединительной ткани реципиента (паннуса) на створчатом аппарате всех ксеноаортальных и двух ксеноперикардиальных биопротезов. Паннус присутствовал со стороны выводящего отдела и способствовал фиксации створок к каркасу с ограничением открытия клапана. Крупные кальцификаты были выявлены в створках всех имплантатов, однако тяжелую кальцификацию, выражающуюся в тотальном обызвествлении створчатого аппарата, наблюдали только у трех ксеноперикардиальных биопротезов.

Анализ криосрезов створок, окрашенных гематоксилином Джилла и эозином, показал умеренную клеточную инфильтрацию как ксеноаортальных, так и ксеноперикардиальных биопротезов: клетки реципиента располагались одиночно или небольшими скоплениями на поверхности ксеноткани, а также в разрыхленных предповерхностных слоях, но практически отсутствовали в толще биоматериала (рис. 1). Изучение морфологии клеточных элементов, в частности формы и размера ядер, позволило идентифицировать в составе инфильтратов нейтрофилы, макрофаги и гигантские многоядерные клетки. Наиболее подверженными кле-

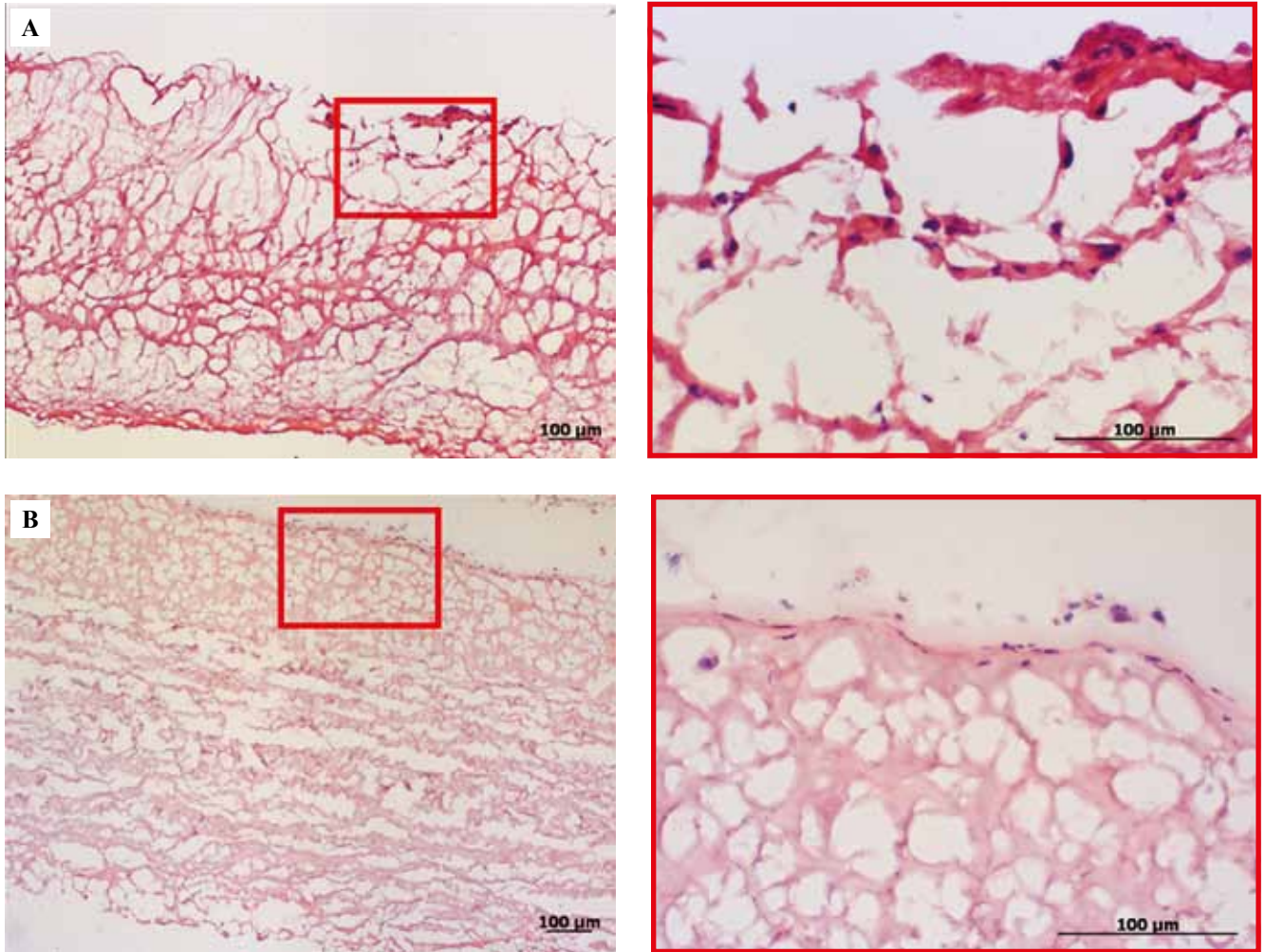


Рис. 1. Примеры клеточной инфильтрации створок ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

А – створка ксеноаортального биопротеза, В – створка ксеноперикардального биопротеза. Окраска гематоксилином Джилла и эозином

Fig. 1. Examples of cellular infiltration of xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthesis heart valve, B – the leaflet of the xenopericardial bioprosthesis heart valve. Gill's H&E staining

точной инфильтрации оказались области вблизи основания створок со стороны выводного отдела. В составе паннуса присутствовали удлиненные веретеновидные клетки, идентифицированные как фибробласты или гладкомышечные клетки, однако они не были выявлены в ксеноткани.

Волокнистая основа ксенотканей как ксеноаортальных, так и ксеноперикардальных биопротезов несла признаки набухания, разволокнения и фрагментации, что объясняет макроскопически наблюдаемое утолщение створчатых аппаратов изученных клапанов. При этом структура внеклеточного матрикса створок ксеноаортальных биопротезов отличалась от таковой ксеноперикардальных имплантатов большей рыхлостью и дезорганизацией волокон. Следует подчеркнуть, что эти различия обусловлены структурными особенностями, а не износом используемого биоматериала: створки аортального клапана свиньи ис-

ходно имеют рыхлый спонгиозный слой, тогда как для перикарда характерна плотная упаковка коллагеновых волокон. Кроме того, эффект дезорганизации матрикса ксеноаортальных биопротезов усиливается ввиду потери гликозаминогликанов спонгиозой при химической стабилизации ксеноткани и последующем функционировании имплантатов в организме реципиента [16].

Анализ компонентного состава внеклеточного матрикса створок ксенобиопротезов посредством пентахромного окрашивания по Мовату продемонстрировал, что волокнистый компонент биоматериала имплантатов обоого типа состоял из коллагена (рис. 2). При этом он не содержал следов эластина и гликозаминогликанов. Последние были обнаружены вблизи клеточных инфильтратов и в составе разросшейся поверх створчатого аппарата соединительной ткани (паннуса).

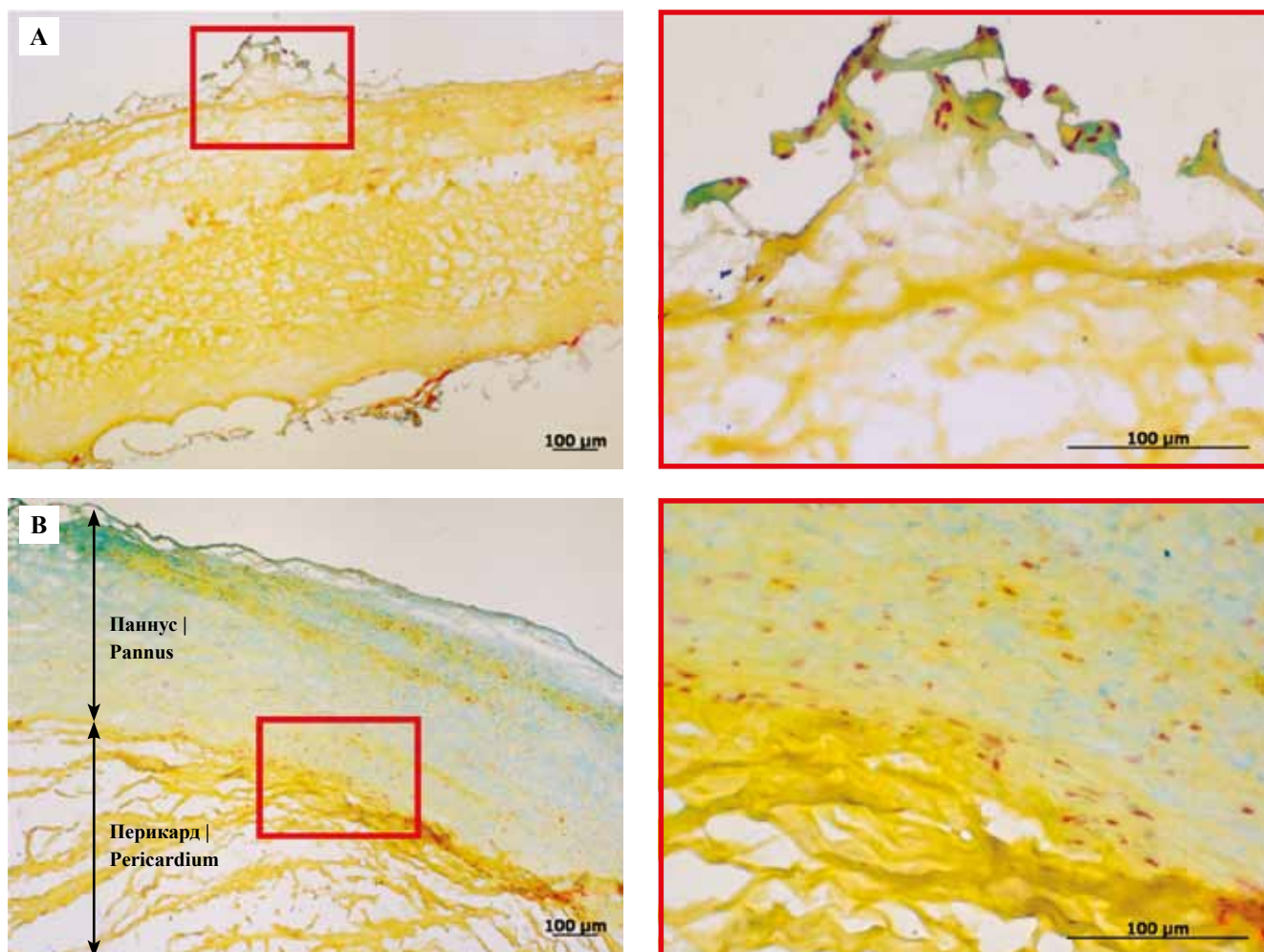


Рис. 2. Компонентный состав створок ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

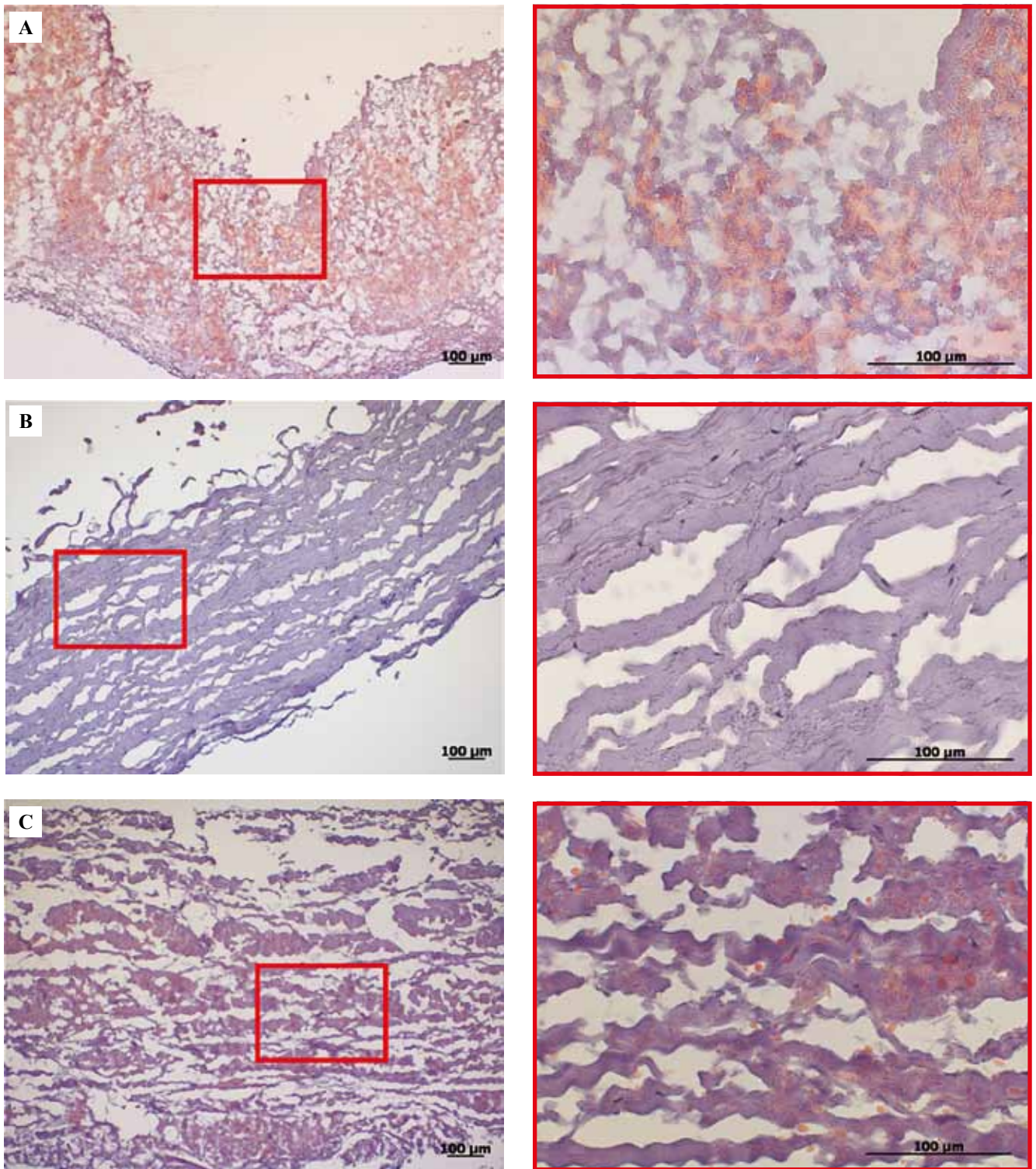
А – створка ксеноаортального биопротеза. Гликозаминогликаны отсутствуют в спонгиозном слое и выявляются вблизи клеточного инфильтрата (голубое окрашивание). В – створка ксеноперикардального биопротеза. Гликозаминогликаны не содержатся в ксеноткани, но присутствуют в паннусе, Окрашка пентахромом по Мовату

Fig. 2. Component composition of xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthesis heart valve. Note the absence of glycosaminoglycans in the sponge layer and their presence near the cell infiltration (blue). B – the leaflet of the xenopericardial bioprosthesis heart valve. Glycosaminoglycans are present in pannus, but not in the xenograft tissue. Movat's pentachrome staining

Окрашивание криосрезов с помощью масляного красного выявило интенсивную липидную инсудацию в створки всех ксеноаортальных биопротезов, тогда как ткани четырех из пяти ксеноперикардальных имплантатов не содержали липидов (рис. 3). Незначительные отложения липидов отмечены в створках

только одного ксеноперикардального биопротеза. Помимо этого, в биоматериале ксеноаортальных, но не ксеноперикардальных биопротезов присутствовали скопления пенистых клеток. Липидные пятна, как правило, не локализовались совместно с клеточными инфильтратами.



*Рис. 3.* Инсудация липидов крови в створки ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

А – створка ксеноартериального биопротеза со значительными отложениями липидов в матриксе. В и С – створки ксеноперикардиальных биопротезов с отсутствующей или слабо выраженной липидной инсудацией, соответственно

*Fig. 3.* Lipid insudation in xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthesis heart valve with significant lipid deposits in the matrix. B and C – leaflets of the xenopericardial bioprosthesis heart valves without or with slightly expressed lipid insudation, respectively

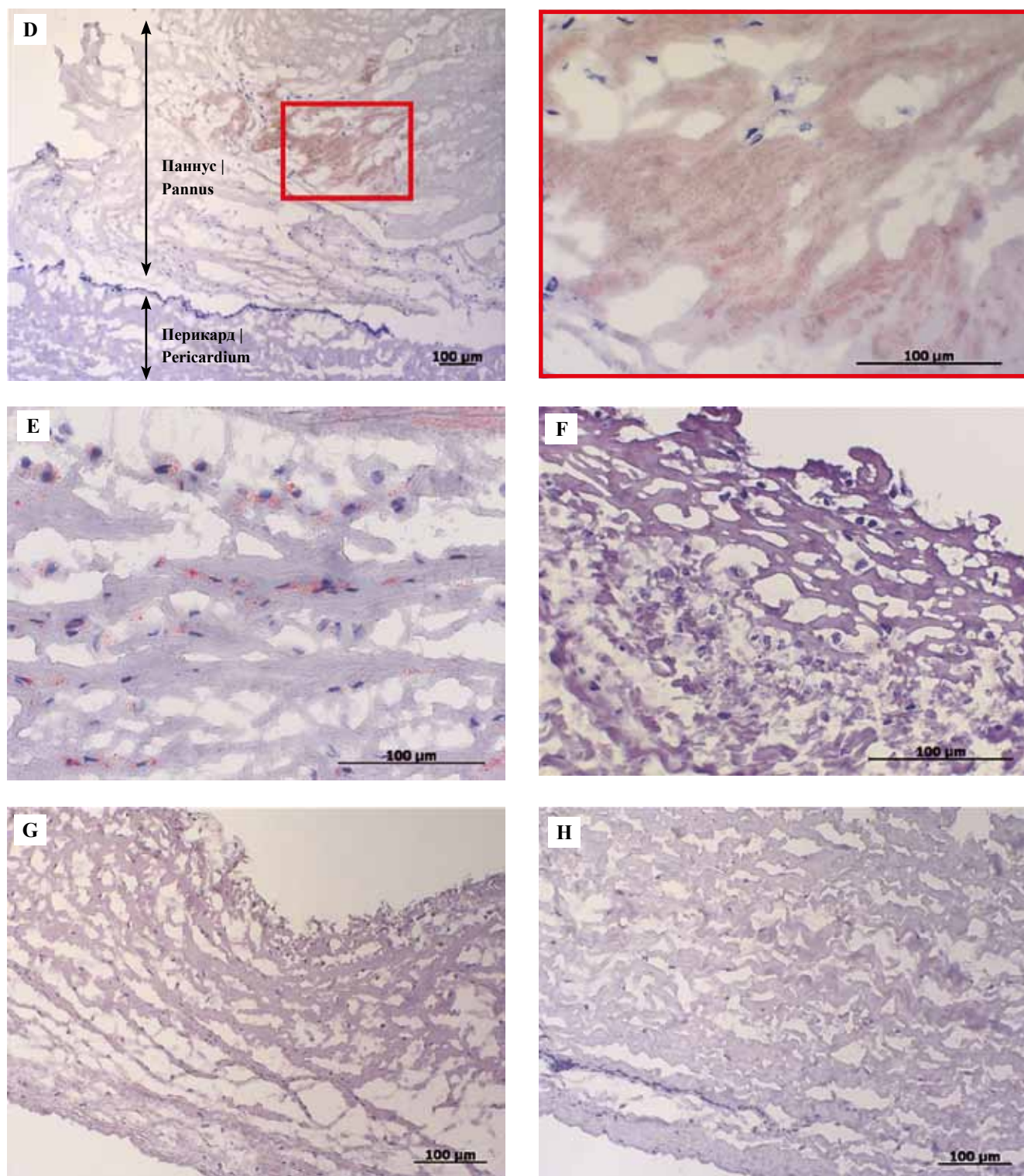


Рис. 3 (окончание). Инсудация липидов крови в створки ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

D – липидные пятна, выявленные в паннусе. E – скопления пенистых клеток в тканях ксеноаортального биопротеза.

F – клеточный инфильтрат в створке ксеноперикардального биопротеза. Нагруженные липидами клетки отсутствуют.

G и H – контрольные образцы створок intactного ксеноаортального и ксеноперикардального биопротезов, соответственно. Оба типа ксенотканей не содержали липидов до имплантации. Окраска масляным красным

Fig. 3 (end). Lipid insudation in xenograft heart valves.

D – lipids detected in pannus. E – clusters of foam cells in the xenoaortic bioprosthetic heart valve.

F – cell infiltration in the leaflet of the xenopericardial bioprosthetic heart valve. Note the absence of foam cells.

G and H – control samples of intact xenoaortic and xenopericardial bioprosthetic heart valves, respectively. Both types of bioprostheses do not contain lipids before the implantation. Oil Red O staining

## Обсуждение

Наблюдаемое в настоящем исследовании распределение клеточных инфильтратов на поверхности створок ксенобиопротезов с незначительным их проникновением в толщу биоматериала хорошо согласуется с данными, полученными нашей группой ранее на другой серии образцов посредством электронной микроскопии [17], а также с результатами исследователей, изучавших клеточную инфильтрацию ксенобиопротезов с применением гистологического и иммуногистохимического методов [8, 9, 18, 19]. Основываясь на характере локализации клеток реципиента в створках ксенобиопротезов, можно сделать вывод, что они редко проникают в глубь протезной ксеноткани, если последняя сохраняет свою структурную целостность.

Данные по компонентному составу биоматериала изученных ксенобиопротезов также хорошо объяснимы с позиции современных знаний о структуре нативных и химически фиксированных ксенотканей. В частности, преобладающим типом белков внеклеточного матрикса в аортальных клапанах свиней и перикарде крупного рогатого скота является коллаген, образующий волокнистую основу ксенотканей [20, 21]. Именно коллаген стабилизируется при обработке биоматериала используемыми в производстве ксенобиопротезов консервантами, такими как глутаровый альдегид и диглицидиловый эфир этиленгликоля [22]. Однако упомянутые вещества не фиксируют другие распространенные компоненты матрикса, включая гликозаминогликаны и эластин, вследствие чего они разрушаются в процессе производства и во время функционирования ксенобиопротезов [23, 24].

Ранее группой Р. Шетти было показано, что единственным источником гликозаминогликанов в трансплантированных биопротезах являются клеточные инфильтраты [9], что подтверждают результаты настоящего исследования. Так, окраска на гликозаминогликаны в створках изученных ксенобиопротезов всегда локализовалась совместно с клетками реципиента. Кроме того, гликозаминогликаны избыточно были в составе соединительной ткани, выросшей на поверхность протезных створок. В то же время нам не удалось подтвердить факт значительного накопления гликозаминогликанов в створках ксенобиопротезов, как это было показано Р. Шетти с соавторами [9].

Выявленные закономерности отложения липидов крови в створках изученной серии ксенобиопротезов показывают, что предложенная ранее гипотеза об их удержании в ксеноткани за счет гликозаминогликанов [9] не может объяснить наблюдаемую картину. Липидные пятна присутствовали даже в полностью лишенном гликозаминогликанов матриксе и не были связаны с клеточными инфильтратами, которые служат источником последних. Таким образом, процесс накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца

осуществляется через механизмы, не требующие наличия продуцирующих гликозаминогликаны клеток реципиента.

Связывание липидов крови гликозаминогликанами обусловлено электростатическим притяжением между отрицательно заряженными сахаридными цепочками последних и положительно заряженными аминокислотами, входящими в состав липопротеинов. Этот механизм задействован в процессе накопления липидов в атеросклеротических бляшках, кальцинированных аортальных клапанах и, возможно, паннусе [25, 26]. Удержание липопротеинов в химически стабилизированном матриксе ксенобиопротезов, вероятнее всего, также происходит благодаря электростатическим взаимодействиям, но не с гликозаминогликанами, а с молекулами консервантов. Молекулы глутарового альдегида и диглицидилового эфира этиленгликоля представляют собой линейные углеродные цепочки, на концах которых находятся, соответственно, альдегидные и эпоксидные группы, несущие отрицательный заряд [22]. При стабилизации биоматериала эти молекулы образуют химические мостики между волокнами коллагена, обеспечивая их химическую сшивку [22, 27]. Тем не менее не все молекулы консерванта взаимодействуют с коллагеном обоими концами, вследствие чего в стабилизированном биоматериале имеются свободные альдегидные и эпоксидные группы, которые могут улавливать положительно заряженные частицы, включая липопротеины крови.

Противоречие между данными, полученными в ходе настоящего исследования и Р. Шетти с соавторами [9], могут быть связаны с особенностями химической обработки исследуемых протезов. Так, при производстве стабилизированных глутаровым альдегидом имплантатов, включая изученные Р. Шетти с коллегами ксенобиопротезы модели Freestyle™, используют дополнительную антикальциевую обработку, маскирующую свободные альдегидные группы. Таким образом, липидная инсудация в биоматериал протезов этого типа происходит лишь в присутствии выделяемых макрофагами гликозаминогликанов, поскольку сам по себе матрикс створок, вероятно, не способен связывать липиды. В свою очередь, стабилизированные диглицидиловым эфиром этиленгликоля ксеноткани изначально более устойчивы к кальцификации, и данная модификация не включена в протокол производства эпоксиобработанных биопротезов как обязательная [12]. Благодаря этому в биоматериале имплантатов могут присутствовать свободные эпоксидные группы, способствующие накоплению липидов даже в отсутствие гликозаминогликанов.

Важно отметить, что интенсивность липидной инсудации зависит от типа биоматериала, из которого изготовлен ксенобиопротез. Данные настоящего исследования показывают, что створки ксеноперикардальных биопротезов практически не подвержены накоплению липидов, тогда как створки ксеноор-

тальных имплантатов содержат значительные липидные отложения. Скорее всего, наблюдаемые различия проявляются ввиду структурных особенностей внеклеточного матрикса, свойственных каждому типу ксенотканей. Для перикарда характерен плотный структурированный матрикс, что препятствует его пропитыванию веществами из плазмы крови. В свою очередь, створки свиного аортального клапана обладают рыхлым губкоподобным матриксом, очевидно, более склонным к абсорбции циркулирующих в плазме соединений.

### Заключение

Основываясь на полученных данных, следует констатировать, что наличие продуцируемых клетками гликозаминогликанов в створках биопротезов клапанов сердца не является обязательным условием для накопления липидов. По-видимому, связывание липидов в биоматериале осуществляется благодаря электростатическим взаимодействиям между аминокислотами липопротеинов и молекулами диглицеридилового эфира этиленгликоля, используемого при изготовлении имплантатов. Таким образом, клеточная инфильтрация и инсудация липидами крови створок ксенобиопротезов являются независимыми процессами.

Основным фактором, влияющим на интенсивность инсудации липидов крови в створчатый аппарат эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца, в данном исследовании оказался тип биоматериала, из которого они изготовлены. В частности, ксеноперикард был менее подвержен пропитке липидами по сравнению со створками свиных клапанов, что можно объяснить разницей в плотности внеклеточного матрикса этих ксенотканей. Впрочем, необходимо отметить, что изученные ксеноаортальные биопротезы функционировали втрое дольше ксеноперикардиальных ( $158,4 \pm 20,9$  месяца против  $57,0 \pm 23,2$ ), поэтому более интенсивное пропитывание липидами крови их створок может являться следствием зависящего от времени механического износа волокнистой основы последних. Тем не менее этот факт не противоречит выводу о том, что створки с более рыхлым внеклеточным матриксом эффективнее аккумулируют липиды. Поскольку матрикс створок ксеноаортальных биопротезов изначально менее структурирован, чем таковой ксеноперикардиальных имплантатов, логично предположить, что он быстрее пропитывается липидами и другими веществами из плазмы крови. Таким образом, ксеноперикард оказывается менее подвержен накоплению циркулирующих в крови и переносимых липидами соединений.

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что ткани ксенобиопротезов подвержены пропитыванию циркулирующими в крови липидами, которые потенциально способны провоцировать развитие или ускорять дегенерацию биоматериала. При этом ксеноперикард выгодно отличается от створок аортальных

клапанов свиной меньшей склонностью к их аккумуляции. С учетом полученных данных уместно предположить, что использование перикарда при производстве ксенобиопротезов в сочетании с применением технологий, нацеленных на предотвращение накопления в их створчатом аппарате различных соединений, может способствовать торможению дегенерации и увеличению сроков функционирования имплантатов. Одними из таких технологий являются дополнительная обработка эпоксиобработанного биоматериала, устраняющая свободные оксидные группы, а также создание на поверхности створок полимерной пленки, препятствующей поступлению в ксеноткань веществ из омывающей ее крови.

### Ограничения исследования

Изученные ксеноаортальные и ксеноперикардиальные биопротезы значительно различались по срокам функционирования и клиническим причинам дисфункций. Тем не менее биопротезы обоого типа в целом были сопоставимы по степени развития дегенеративных изменений ксеноткани, которые привели к дисфункции и необходимости реоперации. Таким образом, мы считаем, что, несмотря на существенную разницу в сроках функционирования, две группы уместно сравнивать в контексте изучения особенностей липидной инсудации.

В настоящее время нет возможности провести дополнительное исследование на выборках биопротезов, сопоставимых по времени функционирования. Это связано со сменой поколений коммерческих моделей. Производство ксеноаортальных биопротезов, отобранных для настоящего исследования, было прекращено в 2009 году, в силу чего на период проведения настоящего исследования у нас нет образцов с ранними дисфункциями. Обратная ситуация наблюдается с ксеноперикардиальными биопротезами: изделия модели «ЮниЛайн» вошли в клиническую практику только с 2008 года, и сегодня доступны имплантаты лишь с ранними проявлениями дисфункции.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Е. Костюнин, Е.А. Овчаренко.

Пробоподготовка, выполнение гистологических окрашиваний – Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов.

Анализ данных – А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова.

Написание текста – А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова.

Редактирование – М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко.

### Author contributions

Conceived and designed the study – A.E. Kostyunin, E.A. Ovcharenko.

Sample preparation, histological staining – T.V. Glushkova, L.A. Bogdanov.

Collected the data and performed the analysis – A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova.

Wrote the paper – A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova.

Edited the manuscript – M.A. Rezvova, E.A. Ovcharenko.



## Литература/References

1. Cote N, Pibarot P, Clavel MA. Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2017;32(2):123–9. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000372.
2. Head SJ, Çelik M, Kappetein AP. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur Heart J*. 2017;38(28):2183–91. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx141.
3. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009;119(7):1034–48. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886.
4. Capodanno D, Petronio AS, Prendergast B, Eltchaninoff H, Vahanian A, Modine T et al. Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: A consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2017;38(45):3382–90. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx303.
5. Dvir D, Bourguignon T, Otto CM, Hahn RT, Rosenhek R, Webb JG et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018;137(4):388–99. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729.
6. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Gentile F et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021;143(5):e72–e227. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000923.
7. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Gentile F et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(4):e25–e197. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.018.
8. Bottio T, Thiene G, Pettenazzo E, Ius P, Bortolotti U, Rizzoli G et al. Hancock II bioprosthesis: A glance at the microscope in mid-long-term explants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(1):99–105. DOI: 10.1016/s0022-5223(03)00131-4.
9. Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(6):471–80. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x.
10. Mahmut A, Mahjoub H, Boulanger MC, Fournier D, Després JP, Pibarot P et al. Lp-PLA2 is associated with structural valve degeneration of bioprostheses. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(2):136–45. DOI: 10.1111/eci.12199.
11. Salaun E, Mahjoub H, Dahou A, Mathieu P, Larose É, Després JP et al. Hemodynamic deterioration of surgically implanted bioprosthetic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(3):241–51. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.04.064.
12. Кудрявцева Ю.А. Биологические протезы клапана сердца. От идеи до клинического применения. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015;4:6–16. DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-6-16.
13. Kudryavtseva YuA. Bioprosthetic heart valves. From idea to clinical use. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015;4:6–16 (In Russ.) DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-6-16.
14. Tam H, Zhang W, Infante D, Parchment N, Sacks M, Vyavahare N. Fixation of bovine pericardium-based tissue biomaterial with irreversible chemistry improves biochemical and biomechanical properties. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017;10(2):194–205. DOI: 10.1007/s12265-017-9733-5.
15. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Puri R, Pibarot P, Rodés-Cabau J. Aortic bioprosthetic valve durability: Incidence, mechanisms, predictors, and management of surgical and transcatheter valve degeneration. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(8):1013–28. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.07.715.
16. Богданов Л.А., Кутихин А.Г. Оптимизация окрашивания элементов системы кровообращения и гепатолениальной системы гематоксилином и эозином. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019;4(4):70–77. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77.
17. Bogdanov LA, Kutikhin AG. Optimization of hematoxylin and eosin staining of heart, blood vessels, liver, and spleen. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;4(4):70–77 (In Russ.) DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77.
18. Grande-Allen KJ, Mako WJ, Calabro A, Shi Y, Ratliff NB, Vesely I. Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(2):251–9. DOI: 10.1002/jbm.a.10475.
19. Kostyunin A, Mukhamadiyarov R, Glushkova T, Bogdanov L, Shishkova D, Osyaev N et al. Ultrastructural pathology of atherosclerosis, calcific aortic valve disease, and bioprosthetic heart valve degeneration: Commonalities and differences. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7434. DOI: 10.3390/ijms21207434.
20. Lepidi H, Casalta JP, Fournier PE, Habib G, Collart F, Raoult D. Quantitative histological examination of bioprosthetic heart valves. *Clin Infect Dis*. 2006;42(5):590–6. DOI: 10.1086/500135.
21. Nair V, Law KB, Li AY, Phillips KR, David TE, Butany J. Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(3):158–68. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.05.003.
22. Aguiari P, Fiorese M, Iop L, Gerosa G, Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;22(1):72–84. DOI: 10.1093/icvts/ivv282.
23. Soares JS, Feaver KR, Zhang W, Kamensky D, Aggarwal A, Sacks MS. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: Characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc Eng Technol*. 2016;7(4):309–51. DOI: 10.1007/s13239-016-0276-8.
24. Dunn RM. Cross-linking in biomaterials: A primer for clinicians. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(5Suppl2):18S–26S. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31825fe6a6.
25. Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, Vyavahare NR. Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins. *Biomaterials*. 2006;27(19):3645–51. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.016.

24. *Lovekamp JJ, Simionescu DT, Mercuri JJ, Zubiate B, Sacks MS, Vyavahare NR.* Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves. *Biomaterials.* 2006;27(8):1507–18. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.003.
25. *Kovanen PT, Pentikäinen MO.* Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: A novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(3-4):86–91. DOI: 10.1016/s1050-1738(99)00013-4.
26. *Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu ZX, Balaban RS.* Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis.* 2014;233(1):113–21. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.038.
27. *Mendoza-Novelo B, Cauch-Rodríguez JV.* Decellularization, stabilization and functionalization of collagenous tissues used as cardiovascular biomaterials. In: R Pignatello (ed.). *Biomaterials – Physics and Chemistry.* London: IntechOpen, 2011. P. 159–182. DOI: 10.5772/25184.

### Информация об авторах

Александр Евгеньевич Костюнин – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Татьяна Владимировна Глушкова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Лев Александрович Богданов – младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Мария Александровна Резцова – младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Евгений Андреевич Овчаренко – кандидат технических наук, заведующий лабораторией новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

### Author information

Alexander E. Kostyunin – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0001-6099-0315>

Tatiana V. Glushkova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0003-4890-0393>

Leo A. Bogdanov – Junior Researcher, Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0003-4124-2316>

Maria A. Rezvova – Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0002-4405-8904>

Evgeniy A. Ovcharenko – Cand. Sci. (Engineering), Head of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0001-7477-3979>

## Морфофункциональные изменения яичек плода человека при внутриутробной гипоксии

Т.В. Палатова<sup>1</sup>, А.Б. Бучарская<sup>2</sup>, Е.С. Воронина<sup>1</sup>, А.В. Медведева<sup>1</sup>,  
С.С. Пахомий<sup>1</sup>, О.С. Годяге<sup>1</sup>, Г.Н. Маслякова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

<sup>2</sup> НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

**Резюме. Введение.** Внутриутробная гипоксия занимает важное место среди факторов риска нарушений развития плода и является одним из самых частых осложнений при беременности. Формирование гипоксии в антенатальном периоде нарушает развитие половой системы плода, что в дальнейшем приводит к негативным последствиям. Цель исследования – изучить влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные особенности развития семенников плодов в разные периоды гестации. **Материалы и методы.** Ткани яичек 78 плодов (аутопсийный материал), умерших на сроке гестации от 19-й до 40-й недели, были исследованы гистологическими и иммуногистохимическими методами (с использованием антител к Ki-67, Vcl 2, AR, ER, FGF).

**Результаты.** При морфометрическом исследовании обнаружено уменьшение количества канальцев, количества клеток в канальцах, площади канальцев с нарастанием площади стромы. При иммуногистохимическом исследовании отмечались слабая экспрессия маркера пролиферации и апоптоза, выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора и преимущественно слабая андрогенового рецептора. Экспрессия фактора роста фибробластов нарастала до 29-й недели, затем резко снижалась. **Заключение.** В результате проведенных исследований было показано, что хроническая гипоксия приводит к повреждению половых клеток и атрофии желез в яичках плодов, а также развитию компенсаторных механизмов, проявляющихся в экспрессии ингибитора апоптоза. Слабая экспрессия андрогенового рецептора и выраженная экспрессия эстрогенового рецептора на протяжении всех периодов гестации свидетельствуют о нарушении процессов пролиферации и снижении функциональной активности интерстициальных эндокриноцитов на фоне гипоксии. Данные структурные изменения в морфогенезе яичек могут приводить к нарушениям фертильности.

**Ключевые слова:** гипоксия, яичко, иммуногистохимия, нарушение фертильности, антенатальный период

**Для корреспонденции:** Татьяна Васильевна Палатова. E-mail: iamnot88@bk.ru

**Для цитирования:** Палатова Т.В., Бучарская А.Б., Воронина Е.С., Медведева А.В., Пахомий С.С., Годяге О.С., Маслякова Г.Н. Морфофункциональные изменения яичек плода человека при внутриутробной гипоксии. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):43–53. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.43-53.

**Финансирование.** Исследование было частично поддержано в рамках выполнения НИР Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского (№ АААА-А18-118032190090-2).

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

Статья поступила 14.10.2021. Получена после рецензирования 17.01.2022. Принята в печать 28.02.2022.

## Morphological and functional features in human fetal testicles during prenatal hypoxia

T.V. Palatova<sup>1</sup>, A.B. Bucharskaya<sup>2</sup>, E.S. Voronina<sup>1</sup>, A.V. Medvedeva<sup>1</sup>,  
S.S. Pahomy<sup>1</sup>, O.S. Godage<sup>1</sup>, G.N. Maslyakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Fundamental and Clinic Uronephrology, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia

**Abstract. Introduction.** Intrauterine hypoxia is one of the most frequent complications in pregnancy. It is one of the risk factors of fetal development disorders. In the antenatal period, the effects of hypoxia on reproductive system can impair fetus development and lead to negative consequences. The aim was to study

pathological and functional features of testes development in different periods of gestation with chronic intrauterine hypoxia.

*Materials and methods.* We examined autopsies of testicular tissues of 78 fetuses deceased at gestation weeks 19–40. Histological and immunohistochemical methods (using antibodies to Ki-67, Bcl 2, AR, ER, and FGF) were employed.

*Results.* Morphometric examination showed a decrease in the number of tubules, cells in the tubules, and the area of the tubules with a significant increase in the stromal area. Immunohistochemistry revealed a weak expression of proliferation and apoptosis marker, a pronounced diffuse expression of estrogen receptor, and a weak expression of androgen receptor. Fibroblast growth factor expression was increasing up to week 29 and then sharply decreased.

*Conclusion.* Chronic hypoxia leads to damage of germ cells and gland atrophy in the testicles of fetuses. Prolonged oxygen deprivation in the testicular tissue triggers compensatory mechanisms, which manifest in the apoptosis inhibitor expression. Hypoxia disrupts proliferation processes and reduces the functional activity of interstitial endocrinocytes, which is confirmed by the weak AR expression and pronounced ER expression during all gestation periods. These structural changes in testicular morphogenesis may lead to impaired fertility.

**Keywords:** hypoxia, testicle, immunohistochemistry, fertility disorders, antenatal period

**Corresponding author:** Tatyana V. Palatova. E-mail: iamnot88@bk.ru

**For citation:** Palatova T.V., Bucharskaya A.B., Voronina E.S., Medvedeva A.V., Pahomy S.S., Godage O.S., Maslyakova G.N. Morphological and functional changes features in human fetal testicles during prenatal hypoxia. *Clin. exp. morphology.* 2022;11(2):43–53 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.43-53.

**Funding.** The study was partially supported as part of the research project V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University (No. AAAA-A18-118032190090-2).

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

**Received** 14.10.2021. **Received in revised form** 17.01.2022. **Accepted** 28.02.2022.

## Введение

Репродуктивная система плода начинает формироваться внутриутробно с 8–9-й недели гестации. Развитие мужской половой системы требует активной деятельности генетических и гормональных факторов, к которым относятся продукты Y-хромосомы и продукты секреции тестикулов самого эмбриона [1–3].

Одним из наиболее значимых факторов паракриной регуляции в яичке является влияние тестостерона, вырабатываемого локально интерстициальными эндокриноцитами [3]. Исследования показали [4], что у животных с выключенными рецепторами андрогенов в перитубулярных миоидных клетках определяются нарушение функции sustentоцитов, азооспермия и бесплодие.

Сустентоциты вырабатывают различные факторы роста, включая фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), который действует в качестве паракриного регулятора и способствует обновлению и развитию зародышевых клеток, интерстициальных эндокриноцитов и перитубулярных миоидных клеток [5–7].

Среди факторов риска нарушений развития плода важное место занимает гипоксия, которая является одним из самых частых осложнений при беременности. Воздействие гипоксии на развивающуюся половую систему плода может нарушить дальнейшее ее развитие и привести к негативным последствиям [2, 8, 9].

Цель исследования – изучить влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные

особенности развития семенников плодов в разные периоды гестации.

## Материалы и методы

Проведена морфологическая оценка яичек 78 плодов (аутопсийный материал), умерших на сроке гестации от 19-й до 40-й недели. Весь аутопсийный материал был разделен на две группы. Первую группу (основную) составили 47 плодов, умерших в результате множественных пороков развития, асфиксии на фоне тяжелого течения гестоза, инфекционных заболеваний матери с последующим инфицированием последа. Основным критерием включения в основную группу являлось наличие хронической внутриутробной гипоксии плода, выявляемое при аутопсии (признаки задержки внутриутробного развития) и исследовании последа. У всех плодов данной группы на основании морфологического исследования последа отмечены признаки хронической плацентарной недостаточности в виде ишемических и геморрагических инфарктов, отложения фибриноида на поверхности ворсин, склероза ворсин, выраженности синцитиальных почек, инфицирования последа.

Вторую группу (сравнения) составили плоды (31 случай), умершие интра- или антенатально в результате ante- и интранатальной асфиксии, обусловленной острым нарушением маточно-плацентарного кровообращения вследствие, как правило, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты.

Таблица 1 | Table 1

Масса и длина тела плодов при острой и хронической гипоксии |  
Weight and body length of the fetuses in acute and chronic hypoxia

Параметр   Parameter	Острая гипоксия   Acute hypoxia Me [25; 75]				Хроническая гипоксия   Chronic hypoxia Me [25; 75]			
	19–22	23–25	26–29	30–40	19–22	23–25	26–29	30–40
Срок гестации, недели   Gestation period, weeks								
Число случаев, n   Number of patients, n	10	8	7	6	15	14	9	9
Масса плода, г   Weight of the fetus, g	479 [455; 487]	640 [554; 850]	1035 [980; 1090]	3260 [2517; 3362]	477,5 [456; 490]	600 [480; 613]	930 [670; 1080]	1550 [1190; 1810]
Длина тела плода, см   Body length of the fetus, cm	24 [22; 25]	31 [27; 34]	36 [32; 40]	49 [45; 51]	23 [21; 24]	29 [25; 31]	35 [28; 38]	43 [33; 44]

Характеристика плодов, вошедших в исследование, представлена в таблице 1.

Изъятые на секции яички плодов после фиксации в 10% растворе нейтрального формалина и проводки по спиртам возрастающей концентрации заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозинном. Морфометрический анализ гистологических препаратов и фотографирование проводили с помощью микровизора медицинского проходящего света  $\mu$ Vizo-101 («ЛЮМО», Россия).

В каждом случае при  $\times 246,4$  и  $\times 774$  проводили подсчет следующих показателей: количество канальцев, количество клеток в канальцах, количество сосудов в строме, количество интерстициальных эндокриноцитов, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы.

После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ исследование согласно стандартному протоколу ИГХ окрашивания. В качестве системы визуализации использовали REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, США). Панель антител приведена в таблице 2.

При проведении реакции с иммуногистохимическими маркерами использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводили для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий

окрашивания и повышения объективности полученных результатов. Оценку ИГХ реакции проводили в 30 полях зрения при  $\times 774$  путем подсчета процента клеток, дающих положительную экспрессию, и оценивали их в процентах от поля зрения на этом увеличении. Степень выраженности экспрессии оценивали количественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

При статистическом анализе полученных результатов использовали пакеты компьютерных программ IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM, США), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США).

Процедуры статистического анализа выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). При проверке выборочных совокупностей исследуемых величин на нормальность распределения по методу Колмогорова–Смирнова выявлено, что распределение исследуемых параметров отличается от нормального, поэтому для анализа количественных признаков использовали методы непараметрической статистики с расчетом медианы и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили) – Me [25; 75]. Морфометрические показатели попарно сравнивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ . Сравнение показателей иммуногистохимической реакции проводили с помощью критерия Фишера. Различия были достоверны при  $\phi_{эмп} \geq 2,31$ .

Таблица 2 | Table 2

Характеристика антител для ИГХ исследования |  
Characteristics of the antibodies used in the study

Антитело   Antibody	Клон   Clone	Разведение   Dilution	Фирма, страна производитель   Manufacturer
Ki67	clone SP6, ab16667	1:100	Abcam, Великобритания   Abcam, Great Britain
Bcl 2	clone 124	1:100	Dako, Великобритания   Dako, Great Britain
FGFR1	PAb, ab63601	1:50	Abcam, Великобритания   Abcam, Great Britain
Androgen receptor	clone AR441, M3562	1:50	Dako, Великобритания   Dako, Great Britain
Estrogen receptor $\beta$ 1	clone PPG5/10, M7292	1:20	Dako, Великобритания   Dako, Great Britain

## Результаты

### Морфофункциональные особенности яичек плодов в 19–22 недели гестации

В основной группе исследования (плоды с хронической внутриутробной гипоксией) при микроскопии яичек плодов 19–22 недель гестации под плотной соединительнотканной оболочкой определялись округлые и вытянутые семенные канальцы, количество которых колебалось от 13 до 18 в поле зрения при  $\times 246,4$  ( $Me=15$ ) (табл. 3). Базальная мембрана отдельных канальцев была нечеткая, фрагментированная. Медиана диаметра канальцев была равна 0,048 мкм, в то время как при острой гипоксии – 0,052 мкм. Просвета в канальцах не наблюдалось. В канальцах преобладали мелкие клетки, которые располагались хаотично, некоторые из них были дистрофически изменены (рис. 1 А). В одном канальце насчитывали от 33 до 40 клеток при  $\times 774$  ( $Me=37$ ) (табл. 3). По данным литературы [2], крупные и средних размеров половые клетки с центрально расположенным ядром являются сперматогониями типа А. Эти клетки обнаруживались в небольшом количестве, преобладали первичные го-

ноциты и незрелые суспендоциты. Медиана площади паренхимы составила 0,009 мкм<sup>2</sup>. Межканальцевая ткань была образована рыхлой соединительной тканью, в некоторых случаях с признаками отека. Разделения на дольки не наблюдалось. В строме в виде групп и изолированно располагались полигональные клетки с вытянутыми ядрами и крупные эозинофильные округлые клетки с большим ядром – интерстициальные эндокриноциты, медиана составляет 9 клеток в поле зрения. Медиана площади интерстиция составила 0,012 мкм<sup>2</sup>.

В группе сравнения (плоды с острой гипоксией) достоверные отличия наблюдались по следующим показателям: количество, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы.

В группе хронической гипоксии пролиферативная активность эпителия канальцев была слабой (+), в некоторых полях зрения экспрессия маркера Ki 67 отсутствовала (рис. 1 В). Экспрессия маркера апоптоза была слабой (+) и умеренно выраженной (++) в интерстициальных эндокриноцитах, в гоноцитах – слабая (+) или отсутствовала (рис. 1 С). Экспрессия эстрогенового рецептора была выраженной, диффузной (рис. 1 D). Андрогеновый рецептор экспрессировался

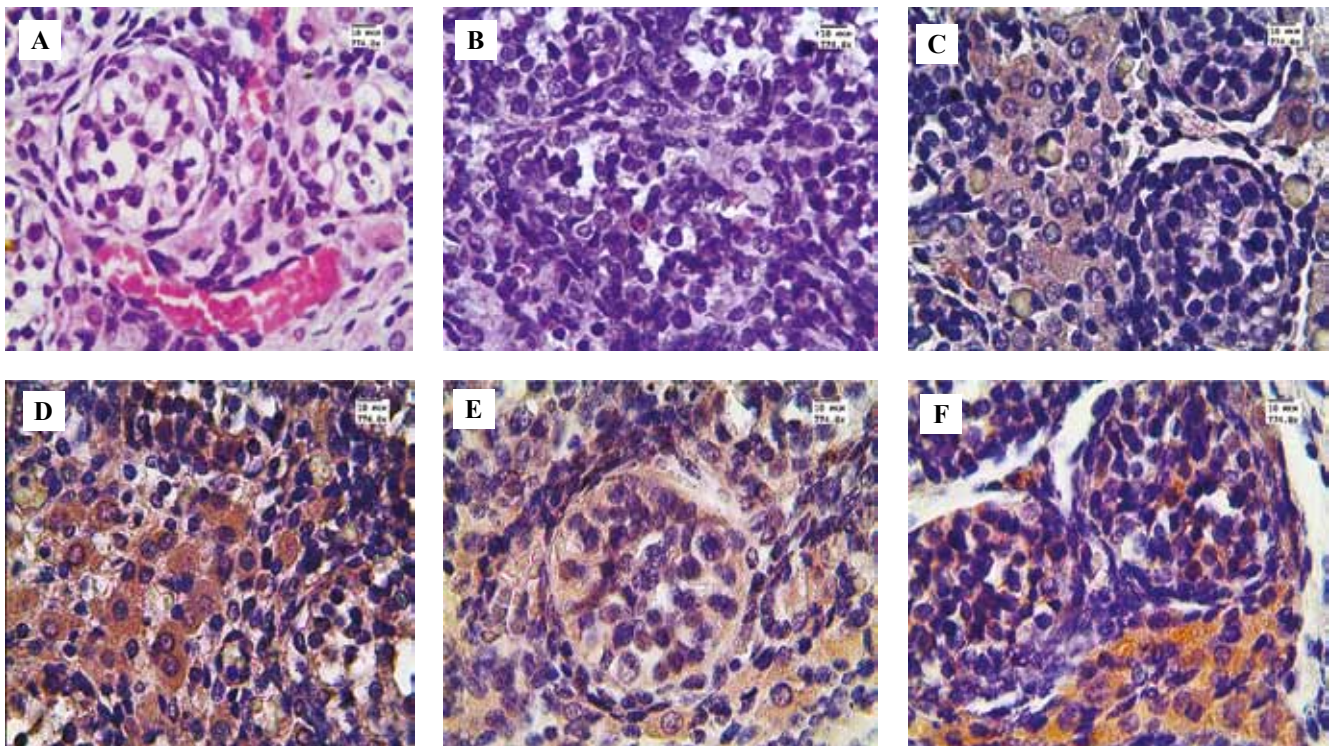


Рис. 1. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 19–22 недели гестации.

А – дистрофия сперматогенного эпителия. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 774$ . В – единичная клетка с экспрессией маркера пролиферации Ki 67. С – умеренная цитоплазматическая реакция интерстиция с маркером апоптоза Bcl 2. D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая диффузная экспрессия андрогенового рецептора AR. F – умеренная экспрессия FGF в интерстиции. B–F – ИГХ окрашивание,  $\times 774$

Fig. 1. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 19–22.

A – dystrophy of the spermatogenic epithelium. H&E stain,  $\times 774$ . B – single cell with expression of the proliferation marker Ki-67. C – moderate cytoplasmic reaction of the apoptosis marker Bcl 2 in the interstitium. D – low diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – weak diffuse expression of the androgen receptor AR. F – moderate expression of FGF in the interstitium. B–F – IHC assay,  $\times 774$

Таблица 3 | Table 3

**Морфометрические показатели структурных компонентов яичек плодов при гипоксии |  
Morphometric parameters of the structural components in the fetal testicular tissue in hypoxia**

Наименование показателя   Parameter name	Значение показателя, Ме [25; 75]   Parameter value, Me [25; 75]								Уровень р   p-value
	19–22		23–25		26–29		30–40		
Срок гестации, недели   Gestation period, weeks									
Гипоксия   Hypoxia	острая   acute n=161	хроническая   chronic n=193	острая   acute n=103	хроническая   chronic n=179	острая   acute n=219	хроническая   chronic n=160	острая   acute n=112	хроническая   chronic n=100	
Количество канальцев в поле зрения, ×246,4   Number of tubules, ×246.4	18 [14; 19]	15 [13; 18]	16 [13; 21]	16 [13; 18]	18 [16; 19]	17 [15; 20]	19 [17; 22]	15 [13; 16]	P <sup>1</sup> =0,0001 P <sup>2</sup> =0,017 P <sup>3</sup> =0,001 P <sup>4</sup> =0,0001
Количество клеток в канальцах, ×774   Number of cells in the tubules, ×774	37 [33; 44]	37 [33; 40]	34 [26; 46]	37 [29; 47]	38 [34; 46]	26 [23; 33]	46 [45; 47]	33 [31; 37]	P <sup>1</sup> =0,057 P <sup>2</sup> =0,824 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,0001
Количество сосудов, ×774   Number of vessels, ×774	5 [3; 8]	6 [3; 8]	7 [3; 14]	11 [7; 22]	7 [3; 11]	11 [7; 14]	10 [9; 11]	22 [15; 27]	P <sup>1</sup> =0,634 P <sup>2</sup> =0,0001 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,0001
Количество интерстициальных эндокриноцитов, ×774   Number of interstitial endocrinocytes, ×774	7 [5; 11]	9 [5; 10]	6 [5; 8]	11 [9; 14]	5 [5; 7]	12 [10; 13]	4 [4; 5]	4 [2; 7]	P <sup>1</sup> =0,115 P <sup>2</sup> =0,0001 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,109
Диаметр канальцев, мкм ×246,4   Tubule diameter, μm ×246.4	0,052 [0,050; 0,058]	0,048 [0,04; 0,052]	0,057 [0,050; 0,061]	0,053 [0,048; 0,063]	0,062 [0,055; 0,068]	0,055 [0,05; 0,06]	0,068 [0,067; 0,070]	0,064 [0,055; 0,068]	P <sup>1</sup> =0,0001 P <sup>2</sup> =0,007 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,0001
Диаметр клеток в канальцах, мкм ×774   Tubular cell diameter, μm ×774	0,008 [0,007; 0,009]	0,007 [0,0065; 0,008]	0,008 [0,007; 0,009]	0,007 [0,006; 0,007]	0,007 [0,006; 0,008]	0,008 [0,007; 0,008]	0,008 [0,008; 0,008]	0,007 [0,007; 0,008]	P <sup>1</sup> =0,013 P <sup>2</sup> =0,001 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,0001
Площадь канальцев мкм <sup>2</sup> , ×774   Tubular area, μm <sup>2</sup> , ×774	0,0110 [0,008; 0,0123]	0,009 [0,007; 0,0101]	0,0119 [0,009; 0,0124]	0,009 [0,006; 0,0105]	0,0127 [0,010; 0,0130]	0,0073 [0,005; 0,0085]	0,0137 [0,0135; 0,0138]	0,0092 [0,0083; 0,011]	P <sup>1</sup> =0,0001 P <sup>2</sup> =0,0001 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,001
Площадь стромы мкм <sup>2</sup> , ×774   Stromal area, μm <sup>2</sup> , ×774	0,0100 [0,008; 0,0130]	0,012 [0,011; 0,0137]	0,0091 [0,008; 0,0112]	0,012 [0,010; 0,0141]	0,0083 [0,008; 0,0104]	0,0137 [0,012; 0,0152]	0,0076 [0,007; 0,0077]	0,0118 [0,01; 0,0126]	P <sup>1</sup> =0,0001 P <sup>2</sup> =0,0001 P <sup>3</sup> =0,0001 P <sup>4</sup> =0,0001

n – число полей зрения

P<sup>1</sup> – при сравнении показателей на 19–22-й неделе гестации

P<sup>2</sup> – при сравнении показателей на 23–25-й неделе гестации

P<sup>3</sup> – при сравнении показателей на 26–29-й неделе гестации

P<sup>4</sup> – при сравнении показателей на 30–40-й неделе гестации

n – number of fields of view

P<sup>1</sup> – at comparing parameters at gestation weeks 19–22

P<sup>2</sup> – at comparing parameters at gestation weeks 23–25

P<sup>3</sup> – at comparing parameters at gestation weeks 26–29

P<sup>4</sup> – at comparing parameters at gestation weeks 30–40

слабо (+) в цитоплазме клеток стромы и гоноцитах (рис. 1 E). FGF определялся слабо (+) и умеренно (++) в цитоплазме в основном в интерстициальных эндокриноцитах, в канальцах он был выражен в отдельных клетках (рис. 1 F). Данные по количеству (%) окрашенных клеток с расчетом медианы и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили) – Me [25; 75] представлены в таблице 4.

#### Гистологические особенности яичек плодов 23–25 недель гестации

В группе плодов с хронической гипоксией при микроскопии яичек в 23–25 недель гестации нара-

тали дистрофические изменения эпителио-сперматогенного слоя, преобладающими клетками оставались клетки мелких размеров. В части канальцев отмечали деструкцию базальной мембраны. Диаметр и площадь канальцев были достоверно ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией (табл. 3). В строме определялись крупные интерстициальные эндокриноциты, располагавшиеся полями (Me равна 11 клеткам в поле зрения) (рис. 2 A). В части случаев отмечали признаки нарушения кровообращения в виде отека, полнокровия сосудов. Медиана площади стромы была равна 0,012 мкм<sup>2</sup> (в группе сравнения – 0,009 мкм<sup>2</sup>). При ИГХ исследовании клетки имели слабую пролиферативную активность,

Таблица 4 | Table 4

#### Экспрессия иммуногистохимических маркеров в яичках плода при различных сроках гестации | Immunohistochemical marker expression in the testicles of the fetus at various gestation weeks

Показатель   Parameter	Значение показателя, Me [25; 75]   Parameter value, Me [25; 75]								Уровень p   p-value
	19–22		23–25		26–29		30–40		
Срок гестации, недели   Gestation period, weeks									
Гипоксия   Нуроксия	острая   acute	хроническая   chronic	острая   acute	хроническая   chronic	острая   acute	хроническая   chronic	острая   acute	хроническая   chronic	
Ki-67	12 [10; 19]	1 [0; 2]	12 [9; 13]	2 [1; 3]	32 [29; 40]	27 [19; 35]	30 [27; 34]	11 [2; 17]	$\phi^1=3,585^*$ $\phi^2=2,991^*$ $\phi^3=1,64$ $\phi^4=3,41^*$
Bcl 2	11 [9; 12]	21 [17; 32]	22 [19; 24]	15 [12; 18]	11 [9; 15]	12 [9; 13]	7 [5; 10]	11 [8; 13]	$\phi^1=1,952$ $\phi^2=1,28$ $\phi^3=0,22$ $\phi^4=0,99$
ER	16 [11; 25]	95 [87; 99]	15 [14; 22]	80 [80; 90]	1 [0; 2]	94 [91; 96]	4 [1; 6]	98 [95; 100]	$\phi^1=13,21^*$ $\phi^2=10,03^*$ $\phi^3=17,30^*$ $\phi^4=15,22^*$
AR	90 [85; 95]	70 [50; 70]	85 [80; 92]	60 [50; 71]	50 [45; 60]	40 [35; 42]	43 [40; 48]	65 [55; 72]	$\phi^1=3,65^*$ $\phi^2=4,06^*$ $\phi^3=1,43$ $\phi^4=3,15^*$
FGFR	36 [25; 50]	45 [35; 50]	60 [47; 67]	50 [38; 61]	65 [60; 70]	75 [70; 80]	11 [9; 15]	7 [5; 9]	$\phi^1=1,30$ $\phi^2=1,42$ $\phi^3=1,55$ $\phi^4=0,99$

$\phi^1$  – при сравнении показателей на 19–22-й неделе гестации

$\phi^2$  – при сравнении показателей на 23–25-й неделе гестации

$\phi^3$  – при сравнении показателей на 26–29-й неделе гестации

$\phi^4$  – при сравнении показателей на 30–40-й неделе гестации

\* – различия достоверны

$\phi^1$  – at comparing parameters at gestation weeks 19–22

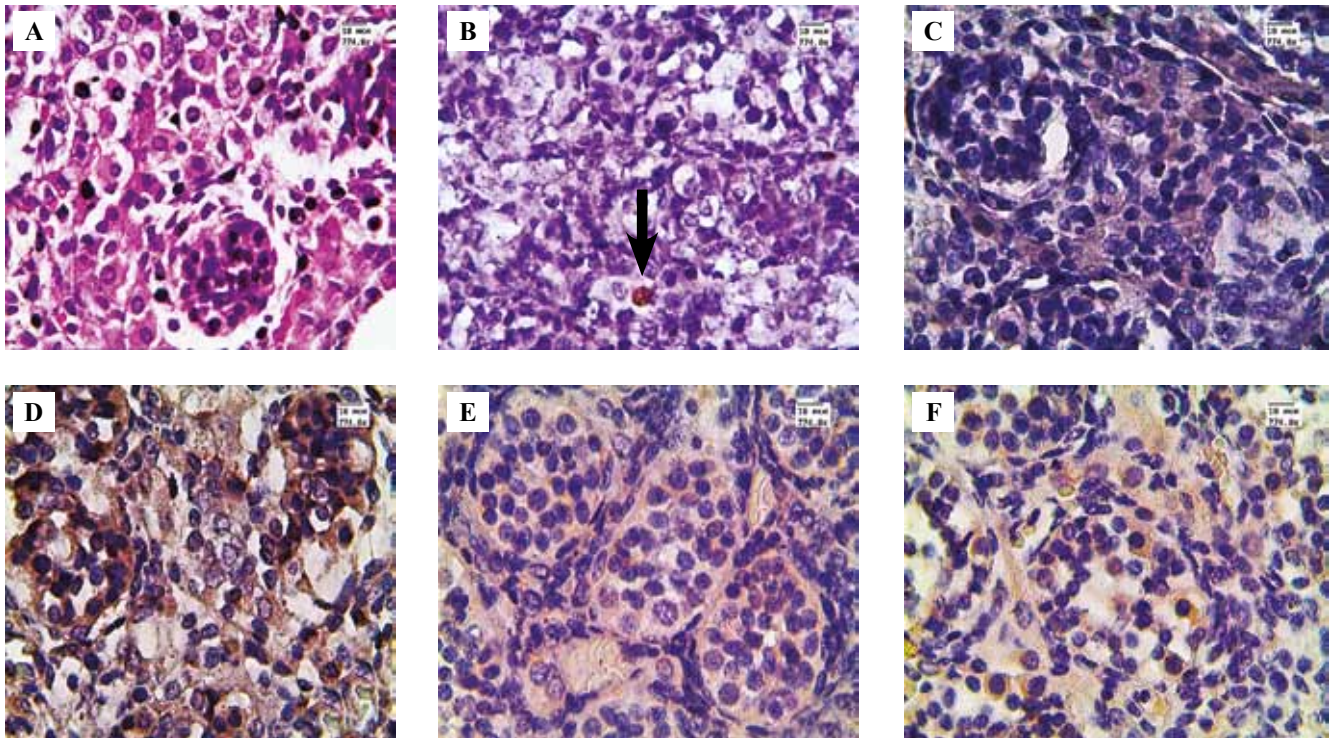
$\phi^2$  – at comparing parameters at gestation weeks 23–25

$\phi^3$  – at comparing parameters at gestation weeks 26–29

$\phi^4$  – at comparing parameters at gestation weeks 30–40

\* – differences are reliable





**Рис. 2.** Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 23–25 недель гестации. А – отсутствие просвета в канальце, большое количество клеток Лейдига. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 774$ . В – единичная клетка с экспрессией маркера пролиферации Ki 67 (стрелка). С – слабая цитоплазматическая реакция интерстиция с маркером апоптоза Bcl 2. D – умеренная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая экспрессия андрогенового рецептора AR. F – слабая экспрессия FGF в интерстиции и эпителии канальцев. В–F – ИГХ окрашивание,  $\times 774$

**Fig. 2.** Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 23–25.

A – the absence of a lumen in the tubule, a large number of Leydig cells. H&E stain,  $\times 774$ . B – single cell with expression of the proliferation marker Ki 67 (arrow). C – low cytoplasmic reaction with apoptosis marker Bcl 2 in the interstitium. D – moderate diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – low expression of the androgen receptor AR. F – low expression of FGF in the interstitium and epithelium of the tubules. B–F – IHC assay,  $\times 774$

экспрессия маркера апоптоза была умеренно и слабо выраженной в интерстициальных эндокриноцитах и гоноцитах (рис. 2 В, С). Экспрессия маркера эстрогенового рецептора оставалась сильно выраженной (+++) в канальцах и умеренно выраженной (++) в интерстиции (рис. 2 D). Андрогеновый рецептор определялся в цитоплазме в гоноцитах и клетках интерстиция (рис. 2 E). FGF так же, как и в более ранний период, слабо (+) экспрессировался в интерстициальных эндокриноцитах и клетках эпителио-сперматогенного слоя (рис. 2 F, табл. 2).

В группе сравнения (плоды с острой гипоксией) отмечалось преобладание канальцевой ткани. Клетки сперматогенного эпителия находились ближе к базальной мембране, формируя просвет в извитых семенных канальцах. Морфометрические параметры приведены в таблице 3.

#### *Гистологические особенности яичек плодов 26–29 недель гестации*

В 26–29 недель гестации в яичках плодов основной группы базальная мембрана части канальцев была

разрушена, эпителиоциты дистрофически изменены, располагались хаотично (рис. 3 А). В 50% случаев наблюдали отслойку эпителио-сперматогенного слоя от базальной мембраны. Медиана числа клеток в канальце в этот период достоверно уменьшалась по сравнению с группой острой гипоксии: с 38 клеток в основной группе до 26 в группе сравнения. Стромальный компонент доминировал над паренхиматозным, и медиана площади стромы была равна  $0,0137 \text{ мкм}^2$ , что оказалось выше в сравнении с группой плодов, умерших от острой гипоксии ( $0,0083 \text{ мкм}^2$ ). При ИГХ исследовании в этот период было установлено усиление пролиферативной активности в эпителии канальцев. Экспрессия маркера апоптоза была выраженной (+++) в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках, в канальцах отмечалась слабая (+) экспрессия в единичных клетках (рис. 3 В, С). Экспрессия маркера эстрогенового рецептора в канальцах была ярко выраженной (+++), в интерстиции – умеренно (++) (рис. 3 D). По сравнению с группой острой гипоксии количество экспрессирующих эстрогеновый рецептор клеток в группе

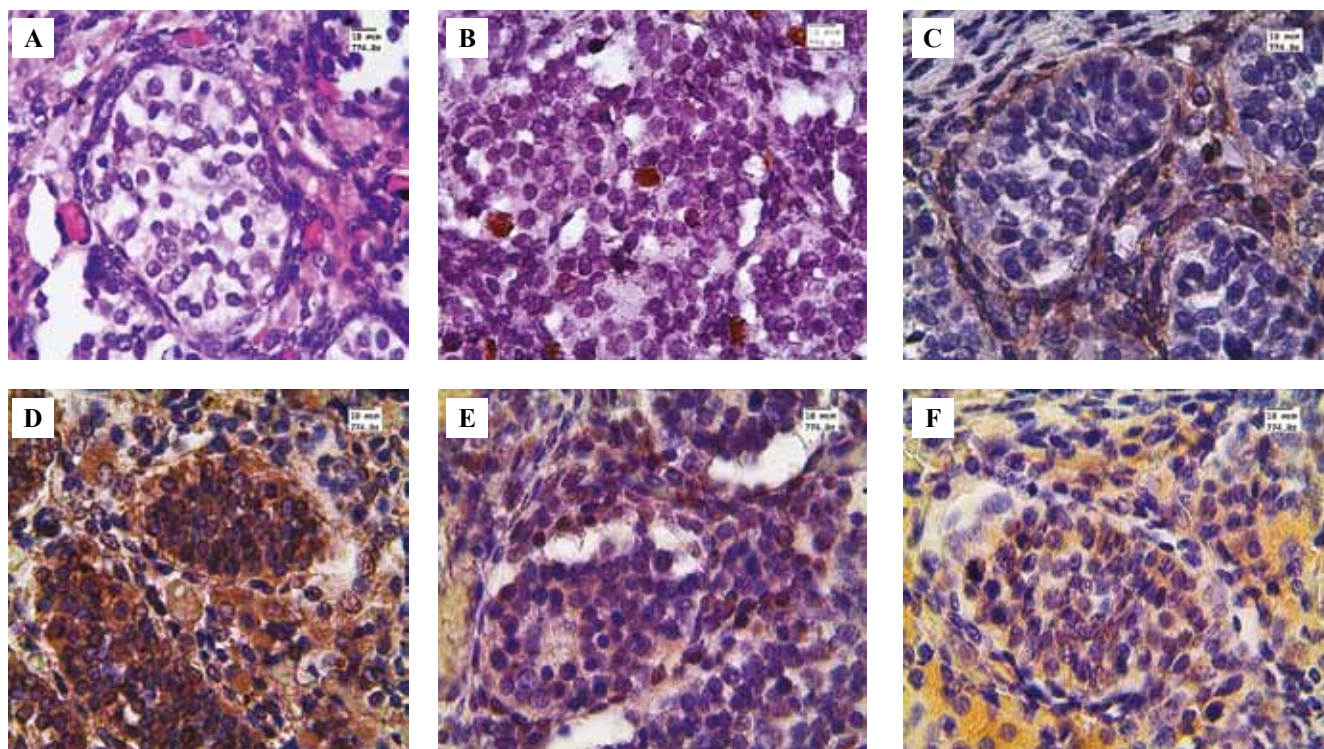


Рис. 3. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 26–29 недель гестации.

А – хаотичное расположение половых клеток эпителио-сперматогенного слоя. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 774$ . В – рассеянная экспрессия маркера пролиферации Ki 67. С – умеренная перитубулярная реакция с маркером апоптоза Bcl 2. D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – умеренная экспрессия андрогенового рецептора AR. F – слабая экспрессия FGF в интерстиции и эпителии канальцев. В–F – ИГХ окрашивание,  $\times 774$

Fig. 3. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 26–29.

A – chaotic arrangement of cells in the tubules. H&E stain,  $\times 774$ . B – diffuse expression of the proliferation marker Ki-67. C – moderate peritubular reaction with apoptosis marker Bcl 2. D – moderate diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – moderate expression of the androgen receptor AR. F – low expression of FGF in the interstitium and epithelium of the tubules. B–F – IHC assay,  $\times 774$

плодов с хронической гипоксией увеличилось в 94 раза (табл. 4). Наблюдалась умеренная (++) и слабая (+) экспрессия андрогенового рецептора в эпителии канальцев в интерстициальных и перитубулярных миоидных клетках. В некоторых полях зрения отмечалась ядерная экспрессия в перитубулярных клетках (рис. 3 E). Доля экспрессирующих клеток в группах острой и хронической гипоксии составляла 50% и 40%, соответственно. Экспрессия FGF была умеренной (++) и слабой (+) в интерстициальных эндокриноцитах и в клетках эпителио-сперматогенного слоя в обеих группах (рис. 3 F, табл. 4).

#### Гистологические особенности яичек плодов 30–40 недель гестации

В 30–40 недель гестации в яичках плодов основной группы также преобладал стромальный компонент. Просветы в канальцах не определялись, клетки располагались хаотично (рис. 4 A). Интерстициальная ткань была хорошо васкуляризована ( $Me=22$  в поле зрения при  $\times 774$ ).

Отмечалась умеренная (+) экспрессия маркера пролиферации в единичных клетках эпителио-сперматогенного слоя, в строме (рис. 4 B). По сравнению с группой плодов, умерших от острой гипоксии, в группе плодов с хронической гипоксией доля клеток, экспрессирующих Ki 67, уменьшилась почти в 3 раза (30% и 11%, соответственно). Экспрессия маркера апоптоза наблюдалась преимущественно в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках и была слабо выраженной (+) (рис. 4 C). Экспрессия эстрогенового рецептора была выраженной (+++) в эпителии канальцев, умеренной (++) в интерстиции (рис. 4 D). Количество экспрессирующих клеток в группе плодов с хронической гипоксией составляло 98%, в группе с острой – 4%. Экспрессия рецепторов андрогена была слабо выражена (+) как в интерстиции, так и в эпителии канальцев (рис. 4 E). Экспрессия FGF была слабой (+) и наблюдалась в отдельных клетках (рис. 4 F, табл. 4). Морфометрические показатели оценки яичек плодов 30–40 недель гестации в основной группе и в группе сравнения приведены в таблице 3.

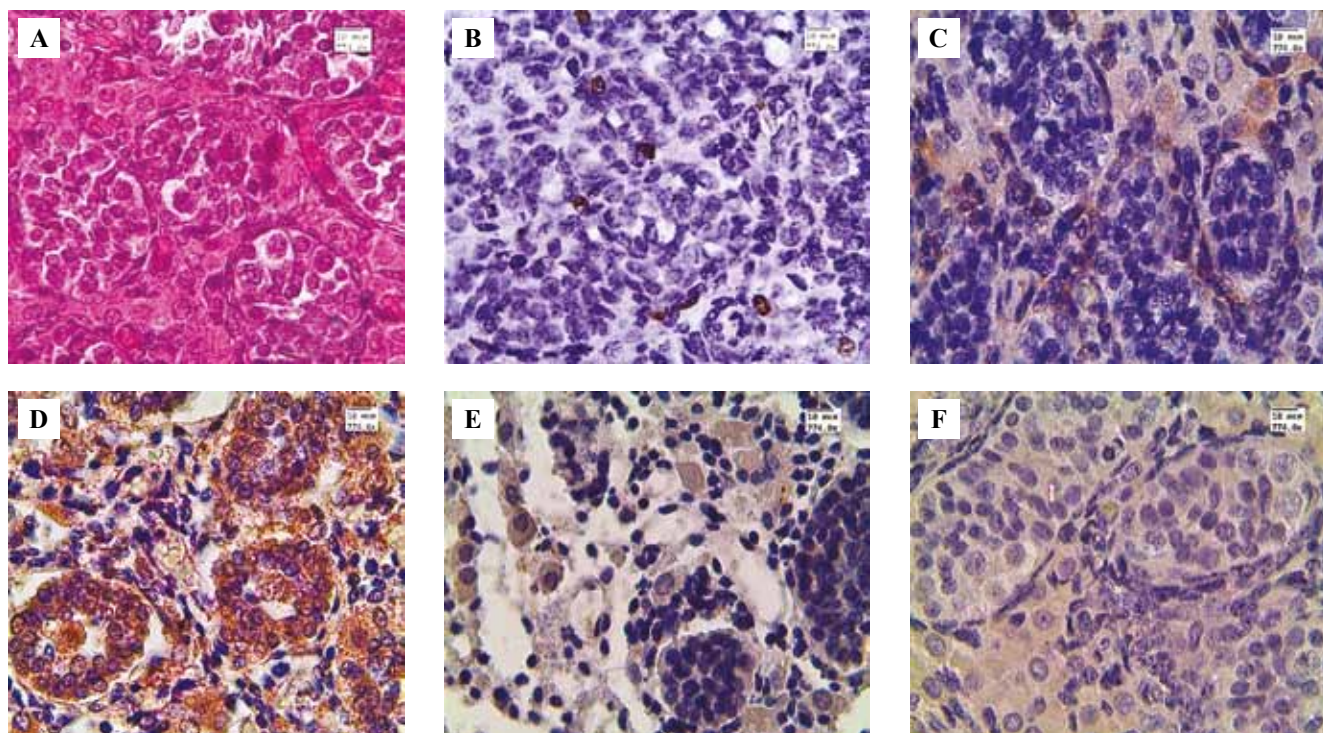


Рис. 4. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 30–40 недель гестации.

А – атрофия канальцев. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 774$ . В – экспрессия маркера пролиферации (Ki 67) в отдельных клетках. С – слабая перитубулярная и интерстициальная реакция с маркером апоптоза Bcl 2.

D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая экспрессия андрогенового рецептора AR. F – отсутствие экспрессии FGF. B–F – ИГХ окрашивание,  $\times 774$

Fig. 4. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 30–40.

A – tubular atrophy. H&E stain,  $\times 774$ . B – expression of the proliferation marker Ki-67 in single cells. C – low peritubular and interstitial reactions with apoptosis marker Bcl 2.

D – pronounced diffuse expression of the estrogen receptor ER.

E – low expression of the androgen receptor. F – absence of expression of FGF. B–F – IHC assay,  $\times 774$

## Обсуждение

В ранее проведенных работах [9, 10] мы изучали морфологию ткани яичек плода при экспериментальной хронической гипоксии у лабораторных животных и на секционном материале у плодов человека со сроками гестации 19–29 недель, а также оценивали экспрессию васкулоэндотелиального фактора. В настоящей работе мы расширили число используемых для ИГХ исследования антител и добавили еще одну группу – яички плодов при сроке гестации 30–40 недель.

При сопоставлении данных роста, массы тела плодов при острой и хронической гипоксии нами отмечено, что во всех подгруппах с увеличением срока гестации росто-весовые показатели закономерно увеличиваются (табл. 1). Надо отметить, что в группах острой и хронической гипоксии в сроки гестации 19–22 недели и 23–25 недель плоды имели практически одинаковые росто-весовые показатели, разница по массе стала появляться в группе 26–29 недель, но и она была статистически недостоверна. В период 30–40 недель гестации росто-весовые показатели плодов, умерших от внутриутробной хронической гипоксии, были достоверно ниже, чем в группе острой гипоксии.

По данным литературы, пролиферация клеток яичка происходит преимущественно в первом триместре беременности. В период с 16-й по 40-ю неделю наблюдаются немногочисленные пролиферирующие клетки, причем располагаются они преимущественно в интерстиции [11].

В нашем исследовании в группе плодов с хронической гипоксией экспрессия маркера пролиферации в тканях яичка во все сроки гестации была ниже, чем в группе плодов, умерших от острой асфиксии. В сроки гестации 30–40 недель отмечали самые низкие показатели пролиферативной активности, в то время как в группе плодов с острой гипоксией уровень пролиферативной активности клеток в яичке практически не изменялся.

Экспрессия Bcl 2 в яичке изменяется в зависимости от срока гестации. В первом триместре она наблюдается в sustentоцитах и интерстициальных эндокриноцитах, во втором триместре – в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках, в третьем триместре не обнаруживается. В работе [11] было показано, что экспрессия маркера Bcl 2 в человеческом фетальном семеннике наблюдается только

при значительных изменениях в морфогенезе яичка. Считается, что Bcl 2, являясь ингибитором апоптоза, защищает соматические клетки от апоптоза во время их пролиферации и созревания [11].

В нашем исследовании экспрессия Bcl 2 при хронической гипоксии была слабой (+) и умеренно выраженной (++) во все периоды гестации. Помимо интерстиция и перитубулярных миоидных клеток она наблюдалась и в единичных половых клетках. Количество экспрессирующих клеток постоянно снижалось, но в группе плодов с хронической гипоксией оно было выше, чем у плодов с острой гипоксией. Так, при сроке гестации 19–22 недели экспрессировал 21% клеток (в группе плодов с острой гипоксией – 11%), а в 30–40 недель доля экспрессирующих клеток уменьшалась до 11% (в группе плодов с острой гипоксией – 7%).

Эстрогеновый рецептор является аутокринным и паракринным регулятором развития яичка и играет важную роль, особенно в период максимальной восприимчивости яичка к различного рода нарушениям.

Проведенное исследование показало, что при хронической гипоксии наблюдается выраженная (++++) диффузная экспрессия эстрогенового рецептора во все сроки гестации. Количество экспрессирующих клеток в группе плодов с хронической гипоксией значительно превышало такие же показатели в группе плодов с острой гипоксией. Полученный результат несколько отличается от данных некоторых зарубежных авторов [12, 13], согласно которым эстрогеновый рецептор экспрессируется в ткани яичка в суспендоцитах, половых клетках и интерстициальных эндокриноцитах и имеет окно экспрессии с 13-й по 22–24-ю неделю гестации.

Андрогены являются наиболее важными гормонами, контролирующими маскулинизацию репродуктивного тракта и гениталий. В период внутриутробного развития отмечается постепенное нарастание концентрации половых гормонов, достигающих максимального уровня к концу второго триместра с последующим прогрессивным снижением до момента рождения. По данным литературы [14, 15], в эмбриональном и раннем постнатальном периодах в яичке активно секретируют андрогены интерстициальные эндокриноциты.

В нашем исследовании в яичках плодов в условиях хронической гипоксии экспрессия андрогенового рецептора была умеренной (++) и слабой (+) в эпителиальных клетках, эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках.

FGF классически известны как гормональные факторы, чаще всего они являются митогенами, и недавние исследования показали [6], что FGF играют ключевую роль в регуляции роста и развития некоторых репродуктивных органов, включая яичко. Доказано, что FGF имеют особое значение для нормального эмбриогенеза и любые отклонения от нормы в их содержании ведут к ряду дефектов в развитии. В нашем исследовании наблюдалось постепенное увеличение экспрессии FGF

с резким снижением процента экспрессирующих клеток в период 30–40 недель гестации. Следует отметить, что схожая динамика наблюдалась и в группе плодов, умерших от острой гипоксии.

## Заключение

Хроническая гипоксия в процессе формирования яичек в антенатальном периоде приводит к негармоничному развитию всех его структур. В результате длительного кислородного голодания в ткани яичек развиваются компенсаторные механизмы, проявляющиеся в виде экспрессии ингибитора апоптоза. Однако гипоксия нарушает процессы пролиферации и снижает функциональную активность интерстициальных эндокриноцитов, что подтверждается слабой экспрессией андрогенового рецептора и выраженной экспрессией эстрогенового рецептора на протяжении всех периодов гестации. Такие изменения в морфогенезе яичек могут привести к снижению фертильности в будущем.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.В. Палатова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, О.С. Годяге.

Сбор и обработка материала – Т.В. Палатова, С.С. Пахомий, А.В. Медведева.

Написание текста – Т.В. Палатова, Е.С. Воронина.

Редактирование – Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.V. Palatova, G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya. O. S. Godage.

Collected the data and performed the analysis – T.V. Palatova, S.S. Pahomy, A.V. Medvedeva.

Wrote the paper – T.V. Palatova, E.S. Voronina.

Edited the manuscript – G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya.

## Литература/References

1. *Kulchenko N.G., Demyashkin G.A.* Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии. Андрология и генитальная хирургия. 2016;17(3):38–42. DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.  
*Kulchenko NG, Demyashkin GA.* Morphological changes in testicular tissue in infertility. *Andrology and Genital Surgery.* 2016;17(3):38–42 (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.
2. *Ivell R, Anand-Ivell R, Morley SD.* Endocrinology of the fetal testis. In: M. Simoni, I. Huhtaniemi (eds.). *Endocrinology of the testis and male reproduction.* Endocrinology. Springer, Cham, 2017. P. 1–28. DOI: 10.1007/978-3-319-29456-8\_7-1.
3. *Shima Y.* Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod Med Biol.* 2019;18(4):323–30. DOI: 10.1002/rmb2.12287.
4. *Burek M, Duda M, Knapczyk K, Kozirowski M, Słomczyńska M.* Tissue-specific distribution of the androgen receptor (AR) in the porcine fetus. *Acta Histochem.* 2007;109(5):358–65. DOI: 10.1016/j.acthis.2007.03.003.
5. *O'Shaughnessy PJ, Verhoeven G, De Gendt K, Monteiro A, Abel MH.* Direct action through the Sertoli cells is essential

- for androgen stimulation of spermatogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(5):2343–8. DOI: 10.1210/en.2009-1333.
6. Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor. *J Diabetes Res*. 2013;2013:489095. DOI: 10.1155/2013/489095.
  7. Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T et al. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res*. 2014;29(7):1627–38. DOI: 10.1002/jbmr.2186.
  8. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB et al. The hypoxic testicle: Physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:929285. DOI: 10.1155/2012/929285.
  9. Palatova TV, Bucharskaya AB, Medvedeva AV, Voronina ES, Maslyakova GN. Influence of chronic intrauterine hypoxia on development of testicles of newborns. *Russian Open Medical Journal*. 2018;7(2):e0201. DOI: 10.15275/rusomj.2018.0201.
  10. Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Медведева А.В., Воронина Е.С. Морфологические особенности яичек плода при хронической внутриутробной гипоксии на разных сроках гестации. *Архив патологии*. 2018;80(4):21–26. DOI: 10.17116/patol201880421.  
Palatova TV, Maslyakova GN, Bucharskaya AB, Medvedeva AV, Voronina ES. Morphological characteristics of fetal testes in chronic intrauterine hypoxia in different gestation periods. *Arkhiv Patologii = Archive of Pathology*. 2018;80(4):21–26 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201880421.
  11. Ketola I, Toppari J, Vaskivuo T, Herva R, Tapanainen JS, Heikinheimo M. Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl 2 and Bax in human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1858–65. DOI: 10.1210/jc.2002-021647.
  12. Boukari K, Ciampi ML, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, Meduri G. Human fetal testis: Source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1885–92. DOI: 10.1093/humrep/dem091.
  13. Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Marchlewska et al. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;50(3):340–5. DOI: 10.5603/19743.
  14. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech*. 2009;72(11):787–95. DOI: 10.1002/jemt.20754.
  15. Merlet J, Moreau E, Habert R, Racine C. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2258–62. DOI: 10.4161/cc.6.18.4654.

### Информация об авторах

Татьяна Васильевна Палатова – ассистент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Алла Борисовна Бучарская – кандидат биологических наук, руководитель Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Елена Сергеевна Воронина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Анна Валентиновна Медведева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Светлана Сергеевна Пахомий – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Ольга Сергеевна Годяге – аспирант кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Галина Никифоровна Маслякова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

### Author information

Tatiana V. Palatova – Assistant, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-3889-5052>

Alla B. Bucharskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Centre of Collective Use, Research Institute of Fundamental and Clinic Urology, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-0503-6486>

Elena S. Voronina – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-4954-4784>

Anna V. Medvedeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-6548-0955>

Svetlana S. Pahomy – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-8540-6901>

Olga S. Godage – Post-graduate Student, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-8234-7010>

Galina N. Maslyakova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-8834-1536>

## Морфологическая оценка сосудистого микроокружения плоскоклеточных карцином легкого

А.А. Епишкина<sup>1</sup>, А.М. Авдалян<sup>1</sup>, Е.В. Гребенкин<sup>1</sup>, Д.С. Кобяков<sup>2</sup>, Д.Н. Проценко<sup>1</sup>, О.В. Зайратьянц<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>2</sup> БУ Ханты-Мансийского автономного округа – Югры Когалымская городская больница, Когалым, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), в том числе плоскоклеточная карцинома, составляет 80% всех случаев рака легкого. Для лечения НМРЛ в настоящее время существуют антиангиогенные препараты. Однако не определены прогностические биомаркеры для отбора пациентов, которым могла бы помочь данная терапия. Цель исследования – оценка корреляции между плотностью сосудистого микроокружения опухоли и ее размером, а также между плотностью опухолевых лимфатических сосудов и наличием/отсутствием метастазов в ипсилатеральные перибронхиальные лимфоузлы.

**Материалы и методы.** Пациенты с морфологически верифицированным диагнозом «плоскоклеточный рак легкого» разделены на группы в зависимости от стадии онкологического процесса: группа 1 (стадия I, n=15) и группа 2 (стадия II, n=15). Выполнялось морфометрическое исследование гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином и иммуногистохимическими методами с использованием антител, специфических и чувствительных для кровеносных (CD34) и лимфатических сосудов (Podoplanin). Оценку плотности сосудов проводили по методике Чокле. Использовался количественный метод оценки плотности сосудов в абсолютных цифрах на площади 0,73 мм<sup>2</sup> при ×200 (оценивали три поля зрения с последующим расчетом медианы показателя плотности сосудов).

**Результаты.** Медиана плотности сосудов микроциркуляторного русла составила в группе 1 и группе 2 в интратуморозной зоне 9,67 (8,67; 10,33) и 10,33 (9,67; 11,67), в перитуморозной – 12 (11,33; 12,67) и 16,33 (15,67; 19,67), соответственно. Медиана плотности лимфатических сосудов составила в группе 1 и группе 2 в интратуморозной зоне 1,5 (1; 2) и 2 (1,67; 3,75), в перитуморозной – 2 (1,92; 2,75) и 3,33 (2,67; 4), соответственно. Выявлена корреляция между размером опухоли и плотностью сосудов микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне (p<0,05) и между плотностью лимфатических сосудов перитуморозной зоны и присутствием метастазов в перибронхиальных лимфатических узлах (p<0,05).

**Заключение.** Особенности сосудистого микроокружения опухоли играют роль в прогрессировании плоскоклеточной карциномы легкого.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак легкого, сосудистое микроокружение опухоли, плотность сосудов опухоли

**Для корреспонденции:** Анна Алексеевна Епишкина. E-mail: afina-nn@mail.ru

**Для цитирования:** Епишкина А.А., Авдалян А.М., Гребенкин Е.В., Кобяков Д.С., Проценко Д.Н., Зайратьянц О.В. Морфологическая оценка сосудистого микроокружения плоскоклеточных карцином легкого. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):54–62. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.54-62.

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

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

Статья поступила 13.01.2022. Получена после рецензирования 24.01.2022. Принята в печать 28.02.2022.

## Morphological assessment of the vascular microenvironment of squamous cell carcinomas of lung

А.А. Epishkina<sup>1</sup>, А.М. Avdalyan<sup>1</sup>, Е.В. Grebenkin<sup>1</sup>, Д.С. Kobayakov<sup>2</sup>, Д.Н. Protsenko<sup>1</sup>, О.В. Zayratyants<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka” of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Kogalym City Hospital, Kogalym, Russia

<sup>3</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Non-small cell lung cancer (NSCLC), including squamous cell carcinoma, accounts for 80% of all lung cancers. Anti-angiogenic drugs are currently available for NSCLC treatment. However, there are no predictive biomarkers for selecting patients who could benefit from this therapy. The aim of

the study was to assess the correlation between the density of the tumor vascular microenvironment and the tumor size, as well as between the density of tumor lymphatic vessels and the presence or absence of metastases in the ipsilateral peribronchial lymph nodes.

**Materials and methods.** Patients with a morphologically verified diagnosis of squamous cell lung carcinoma were divided into 2 groups depending on the stage of cancer: group 1 (stage I, n=15) and group 2 (stage II, n=15). We performed a morphometric study of histological slides stained with hematoxylin and eosin and antibodies to CD34 and Podoplanin (specific and sensitive markers to blood and lymphatic vessels, respectively) with immunohistochemical methods. Vascular density was assessed according to the Chalkley method. We quantitatively evaluated the density of blood vessels in absolute numbers on a 0.73-mm<sup>2</sup> area with a magnification of ×200 (three fields of view were evaluated with subsequent calculation of the mean blood vessels density).

**Results.** The median of vascular density of the microvasculature was 9.67 (8.67; 10.33) and 10.33 (9.67; 11.67) in the intratumoral zone in group 1 and group 2, respectively. In the peritumoral zone, it was 12 (11.33; 12.67) for group 1 and 16.33 (15.67; 19.67) for group 2. The median density of lymphatic vessels in group 1 and group 2 in the intratumoral zone amounted to 1.5 (1; 2) and 2 (1.67; 3.75), respectively; whereas in the peritumoral zone, this parameter was 2 (1.92; 2.75) and 3.33 (2.67; 4) for groups 1 and 2, respectively. We found a correlation between tumor size and vascular density of the microvasculature in the peritumoral zone ( $p < 0.05$ ) and between the density of lymphatic vessels in the peritumoral zone and the presence of metastases in the peribronchial lymph nodes ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** Features of the vascular microenvironment of the tumor contribute to the progression of squamous cell carcinoma of the lung.

**Keywords:** squamous cell lung cancer, tumor vascular microenvironment, tumor vascular density

**For correspondence:** Anna A. Epishkina. E-mail: afina-nn@mail.ru

**For citation:** Epishkina A.A., Avdalyan A.M., Grebenkin E.V., Kobayakov D.S., Protsenko D.N., Zayratyants O.V. Morphological assessment of the vascular microenvironment of squamous cell carcinomas of lung. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):54–62 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.54-62.

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

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

**Received** 13.01.2022. **Received in revised form** 24.01.2022. **Accepted** 28.02.2022.

## Введение

Злокачественные новообразования легких являются одними из самых распространенных среди опухолевой патологии. Так, за период с 2009 по 2019 год распространенность данной патологии в России увеличилась с 83,6 до 100,5 на 100 тыс. населения [1]. По данным международных статистических исследований, рак легких среди всех злокачественных новообразований – ведущая причина смерти у мужчин и вторая ведущая причина смерти (после рака молочной железы) у женщин [2]. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 80% всех случаев рака легких, и только 20–25% пациентов с данной гистологической формой характеризуются 5-летней выживаемостью независимо от стадии [3]. Плоскоклеточная карцинома является одним из гистологических подтипов НМРЛ, который также включает в себя аденокарциному и крупноклеточный рак [4]. Несмотря на клинические улучшения, полученные при применении таргетной или иммунотерапии, у большинства пациентов в конечном счете возникает первичная или вторичная резистентность, что обуславливает неэффективность проводимого лечения. После появления иммунотерапии уделяется внимание изменениям сосудистого микроокружения опухоли [5]. Ангиогенез – прорастание новых сосудов из существующей сосудистой сети – долгое время

считался признаком злокачественного новообразования [6] и предпосылкой для роста опухолей более 1–2 мм<sup>3</sup> в диаметре и их распространения [7]. Для лечения НМРЛ существуют одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) антиангиогенные препараты, нацеленные на рецепторную систему фактора роста эндотелия сосудов, с эффектами, превосходящими действие неангиогенных ингибиторов, согласно недавнему обзору, выполненному S. Hong et al. [8]. Однако не определены прогностические биомаркеры для отбора пациентов, которым могла бы помочь данная терапия [9]. К тому же известно, что в ряде случаев эффективность антиангиогенной терапии оказывается ограниченной в связи с особенностями сосудистого микроокружения опухоли, которые еще недостаточно изучены [10]. Таким образом, актуальной задачей является изучение биологического поведения опухолей легкого, в том числе плоскоклеточных карцином, в зависимости от особенностей их сосудистого микроокружения.

Цель исследования – оценка корреляции между плотностью сосудистого микроокружения опухоли и ее размером, а также между плотностью опухолевых лимфатических сосудов и наличием/отсутствием метастазов в ипсилатеральные перибронхиальные лимфоузлы.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на базе патологоанатомического отделения московского многопрофильного клинического центра «Коммунарка». В исследование вошли пациенты ( $n=30$ ) с впервые выявленным морфологически верифицированным диагнозом «плоскоклеточный рак легкого» со стадией онкологического процесса I (pT1a pN0, pT1b pN0, pT2a pN0) и II (pT1a pN1, pT1b pN1, pT2a pN1, pT2b pN0) (согласно классификации НМРЛ по системе TNM, 8-е издание, 2017), которые были распределены по этому признаку в группу 1 ( $n=15$ ) (стадия I) и группу 2 ( $n=15$ ) (стадия II). Выбор данных стадий обусловлен тем, что эти опухоли являются операбельными и отличаются лучшим прогнозом в отличие от новообразований на более поздних стадиях [11]. В настоящем исследовании не проводилось распределение пациентов по группам в зависимости от степени злокачественности опухоли в связи с небольшим объемом выборки.

С целью оценки сосудистого микроокружения опухоли выполнялось иммуногистохимическое исследование с использованием антител против CD34 (мышинные моноклональные антитела против CD34 – клон QVEnd/10) (Ventana, США) для кровеносных сосудов и Podoplanin (D2-40) (мышинные моноклональные антитела против Podoplanin – клон D2-40) (Cell Marque, США) для лимфатических сосудов.

Для анализа особенностей сосудистого микроокружения опухоли выполнялось морфометрическое исследование гистологических препаратов, окрашенных иммуногистохимическими методами с использованием антител, специфических и чувствительных для кровеносных – CD34 QVEnd/10 (Ventana, США) и лимфатических сосудов – Podoplanin D2-40 (Cell Marque, США). Морфометрическое исследование проводили на сканах гистологических препаратов. Оценивали следующие параметры: 1) плотность кровеносных сосудов в центре (интратуморозная зона) и по периферии (перитуморозная зона) опухолевого поля; 2) плотность лимфатических сосудов в центре (интратуморозная зона) и по периферии (перитуморозная зона) опухолевого поля. Под перитуморозной зоной принималась область на расстоянии от 17 мкм до 170 мкм от края опухоли при увеличении микроскопа  $\times 200$ . С целью объективизации оценки использовалась программа Image J. Основываясь на методе оценки сосудистой плотности Chalkley Count [12], при малом увеличении в репрезентативных срезах опухоли, окрашенных иммуногистохимическими методами, в центре и по периферии были отобраны три наиболее васкуляризованные области – «горячие точки». Использовался количественный способ оценки плотности сосудов в абсолютных цифрах на площади  $0,73 \text{ мм}^2$  при  $\times 200$  (оценивали три поля зрения, а затем рассчитывали медиану и квартильные размахи). Статистический анализ данных осуществлялся с помощью пакетов прикладных программ Microsoft

Excel и Statistica 10. Нормальность распределения выборки исследуемых параметров определяли по методу Колмогорова–Смирнова. Выборки в настоящем исследовании не отвечали критериям нормального распределения, поэтому описание количественных характеристик представлено в виде медианы и первого и третьего квартилей – Me (25%; 75%). С целью статистической оценки связи между исследуемыми параметрами применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для статистического анализа качественных показателей использовался критерий  $\chi^2$  Пирсона. Уровнем статистической значимости был принят показатель 0,05.

## Результаты

В группу 1 (стадия I) и в группу 2 (стадия II) были включены по 15 случаев гистологически верифицированных плоскоклеточных карцином легких. Медиана максимального размера опухоли в группе 1 составила 20 мм (15; 22), в группе 2 – 32 мм (30; 40). В группе 2 в 10 случаях (10/15) имели место метастазы в ипсилатеральные перибронхиальные лимфоузлы.

Медиана плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в исследуемых группах при плоскоклеточном раке легкого представлена в таблице 1.

Результаты гистологического и морфометрического исследования демонстрируют наличие корреляции между размером плоскоклеточной карциномы и плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне как при стадии опухолевого процесса I, так и при стадии II (рис. 1 и 2).

Статистическое исследование с использованием коэффициента корреляции рангов Спирмена ( $r$ ) выявило статистически значимую взаимосвязь между размером опухоли и плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла периферической зоны (инвазивного компартмента) при плоскоклеточном раке легкого ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Взаимосвязь между плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в интратуморозной зоне и размером опухоли не выявлена ни при стадии опухолевого процесса I, ни при стадии II, что продемонстрировано на рисунках 3 и 4.

Корреляция размеров опухоли и плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла интратуморозной зоны при плоскоклеточном раке легкого оказалась статистически незначимой при применении коэффициента корреляции рангов Спирмена ( $r$ ) ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

На рисунке 5 продемонстрирован пример распределения плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в пери- и интратуморозной зоне плоскоклеточной карциномы.

Медиана плотности лимфатических сосудов в исследуемых группах при плоскоклеточном раке легкого представлена в таблице 3.



Таблица 1 | Table 1

**Медиана плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в интра- и перитуморозной зоне в исследуемых группах | Median density of blood vessels of the microvasculature in the intra- and peritumoral zones in the studied groups**

Группы   Groups	Интра-туморозная зона   Intratumoral zone Me (25%; 75%)	Перитуморозная зона   Peritumoral zone Me (25%; 75%)
Группа 1   Group 1	9,67 (8,67; 10,33)	12 (11,33; 12,67)
Группа 2   Group 2	10,33 (9,67; 11,67)	16,33 (15,67; 19,67)

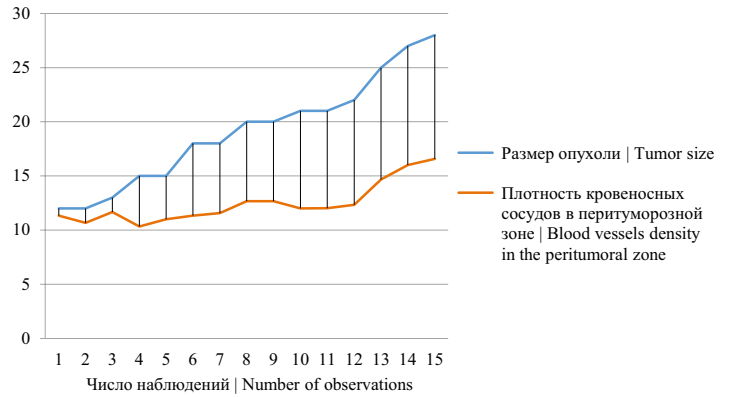


Рис. 1. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне плоскоклеточной карциномы легкого (стадия I)

Fig. 1. Blood vessels in the microvasculature in the peritumoral zone of squamous cell carcinoma of the lung (stage I)

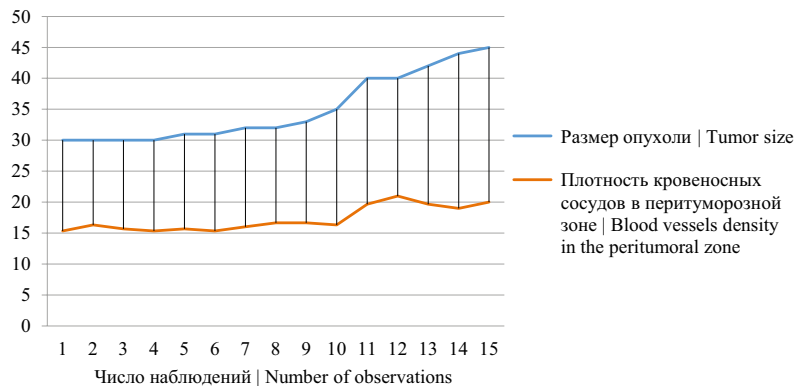


Рис. 2. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне плоскоклеточной карциномы легкого (стадия II)

Fig. 2. Microcirculatory blood vessels in the peritumoral zone of squamous cell carcinoma of the lung (stage II)

Таблица 2 | Table 2

**Оценка статистической значимости зависимости плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в пери- и интра-туморозной зоне опухоли от размера опухоли | Assessment of the statistical significance of the dependence of the blood vessels density of the microvasculature in the peri- and intratumoral zones of the tumor depending on the tumor size**

Стадия заболевания   Stage	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена   Spearman's rank correlation coefficient	p-значение   p-value
Корреляция между размером опухоли и плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в перитуморозной зоне опухоли   Correlation between the tumor size and density of blood vessels of the microvasculature in the peritumoral zone of the tumor		
Стадия I   Stage I	0,820	<0,05
Стадия II   Stage II	0,838	<0,05
Корреляция между размером опухоли и плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в интра-туморозной зоне опухоли   Correlation between the tumor size and density of blood vessels of the microvasculature in the intratumoral zone of the tumor		
Стадия I   Stage I	0,322	>0,05
Стадия II   Stage II	0,173	>0,05

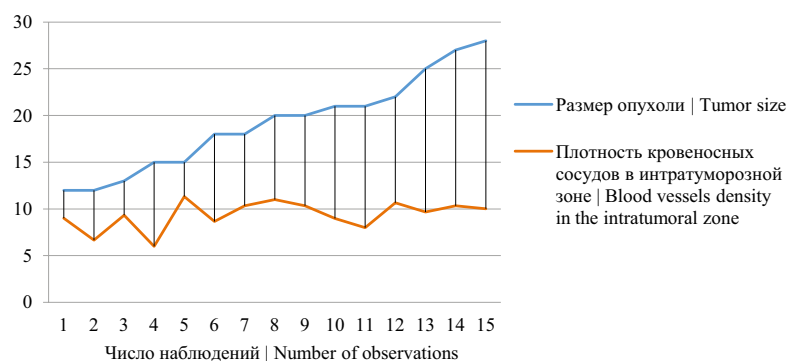


Рис. 3. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла в интратуморозной зоне плоскоклеточной карциномы легкого (стадия I)

Fig. 3. Microcirculatory blood vessels in the intratumoral zone of squamous cell carcinoma of the lung (stage I)

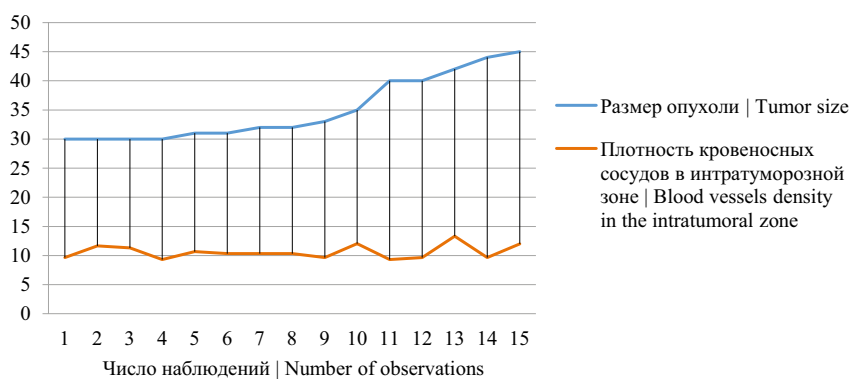


Рис. 4. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла в интратуморозной зоне плоскоклеточной карциномы легкого (стадия II)

Fig. 4. Microcirculatory blood vessels in the intratumoral zone of squamous cell carcinoma of the lung (stage II)

Таблица 3 | Table 3

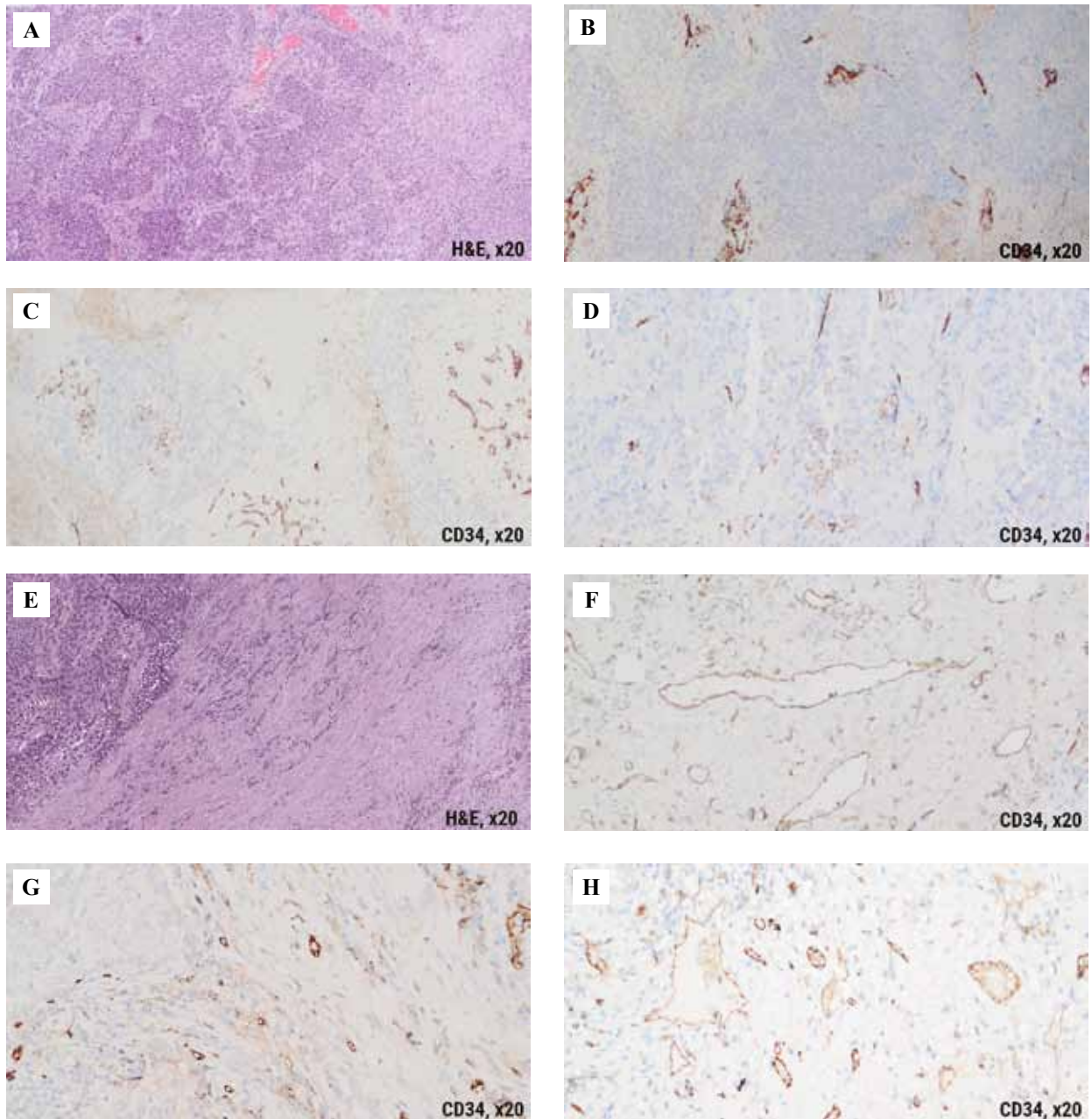
Медиана плотности лимфатических сосудов в интра- и перитуморозной зоне в исследуемых группах |  
Median density of lymphatic vessels in the intra- and peritumoral zones in the studied groups

Группы   Groups	Интратуморозная зона   Intratumoral zone Me (25%; 75%)	Перитуморозная зона   Peritumoral zone Me (25%; 75%)
Группа 1   Group 1	1,5 (1; 2)	2 (1,92; 2,75)
Группа 2   Group 2	2 (1,67; 3,75)	3,33 (2,67; 4)

Таблица 4 | Table 4

Оценка статистической значимости зависимости плотности лимфатических сосудов в пери- и интратуморозной зоне опухоли от размера опухоли |  
Evaluation of the statistical significance of the dependence of lymphatic vessels density in the peri- and intratumoral zones of the tumor on the tumor size

	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена   Spearman's rank correlation coefficient	p-значение   p-value
Корреляция между размером опухоли и плотностью лимфатических сосудов в перитуморозной зоне   Correlation between the tumor size and density of lymphatic vessels in the peritumoral zone		
Группа 1   Group 1	0,067	>0,05
Группа 2   Group 2	0,031	>0,05
Корреляция между размером опухоли и плотностью лимфатических сосудов в интратуморозной зоне   Correlation between tumor size and density of lymphatic vessels in the intratumoral zone		
Группа 1   Group 1	0,025	>0,05
Группа 2   Group 2	0,021	>0,05



*Рис. 5.* Распределение плотности кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в пери- и интраопухолевой зоне плоскоклеточной карциномы: А, В, С, D – интраопухолевая зона; Е, F, G, H – перитуморозная зона. А, Е – окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 200$ ; В, С, D, F, G, H – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD34,  $\times 200$

*Fig. 5.* Distribution of the blood vessels density of the microvasculature in the peri- and intratumoral zone of squamous cell carcinoma of the lung: A, B, C, D – intratumoral zone; E, F, G, H – peritumoral zone. A, E – H&E stain,  $\times 200$ ; B, C, D, F, G, H – immunohistochemical assay with CD34 antibody,  $\times 200$

Было показано отсутствие статистически значимой взаимосвязи между размером опухоли и плотностью лимфатических сосудов интра- и перитуморозной зон при плоскоклеточном раке легкого при использовании коэффициента корреляции рангов Спирмена ( $r$ ) ( $p > 0,05$ ) (рис. 6, табл. 4).

Статистическое исследование с использованием качественного критерия  $\chi^2$  Пирсона выявило наличие

статистически значимой взаимосвязи между плотностью лимфатических сосудов перитуморозной зоны и присутствием метастазов в перибронхиальных лимфатических узлах ( $p < 0,05$ ) и отсутствие корреляции между плотностью лимфатических сосудов интраопухолевой зоны и присутствием метастазов в перибронхиальных лимфатических узлах ( $p > 0,05$ ) при плоскоклеточном раке легкого (табл. 5).

Распределение случаев в зависимости от плотности лимфатических сосудов в пери- и интратуморозной зоне и наличия/отсутствия метастазов в ипсилатеральных перибронхиальных лимфоузлах | Distribution of cases depending on the lymphatic vessels density in the peri- and intratumoral zones and the presence / absence of metastases in the ipsilateral peribronchial lymph nodes

Плотность лимфатических сосудов (перитуморозная зона)   Density of lymphatic vessels (peritumoral zone)	Результативный признак (наличие метастазов)   Effective sign (presence of metastases)	
	да   yes	нет   no
1	n=0	n=3
2	n=1	n=10
≥3	n=9	n=7
Плотность лимфатических сосудов (интратуморозная зона)   Density of lymphatic vessels (intratumoral zone)	Результативный признак (наличие метастазов)   Effective sign (presence of metastases)	
	да   yes	нет   no
1	n=3	n=6
2	n=3	n=8
≥3	n=4	n=6

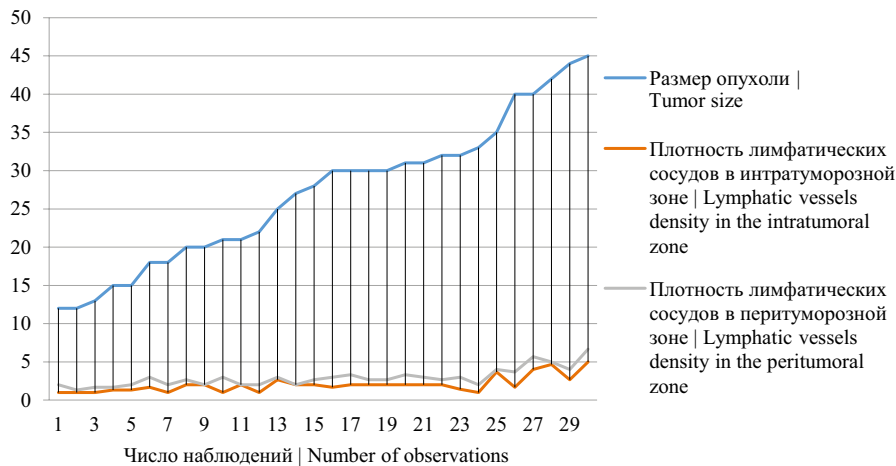


Рис. 6. Лимфатические сосуды в интра- и перитуморозной зоне плоскоклеточной карциномы легкого  
Fig. 6. Lymphatic vessels in the intra- and peritumoral zones of squamous cell carcinoma of the lung

## Обсуждение

Несмотря на современные достижения в вопросе лечения рака легкого, включая хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию и таргетную терапию, прогноз остается плохим из-за наличия локально распространенных или метастатических опухолей у большинства пациентов на момент постановки диагноза [13]. Ангиогенез – процесс, ведущий к образованию новых кровеносных сосудов, является базовым условием для выживания раковых клеток, локального роста опухоли и возникновения отдаленных метастазов [14]. В 1972 году S. Vrem et al. отметили необходимость определения количественной меры опухолевого ангиогенеза и предложили систему классификации опухолей головного мозга человека, основанную на характеристиках эндотелиальных клеток в сочетании с измерениями плотности сосудов [15]. По данным литературы, ангиогенез часто количественно

анализируют путем оценки плотности микрососудов, и данный показатель прогностически ценен при многих опухолях [16]. Некоторые авторы отметили, что измерение плотности микрососудов помогает оценить стадию заболевания, вероятность метастазирования, рецидива или выживания, а также планирование курса лечения [17–20]. P. Macchiarini et al. в своем исследовании показали наличие корреляции между количеством микрососудов, степенью их плотности и возникновением метастазов, а также связь между размером опухоли и пролиферативной активностью [21]. Авторы отметили, что вероятность метастазирования росла по мере увеличения количества сосудов. Метаанализ, выполненный A. Meert et al., продемонстрировал, что высокий уровень плотности микрососудов в первичной опухоли легкого был статистически значимым предиктором плохого прогноза выживаемости при хирургическом лечении немелкоклеточного рака легкого [22].

Тем не менее имеются данные о неоднородности васкуляризованных областей в опухолевой ткани, взятых из одного образца [23]. С. Ushijima et al. сравнили плотность микрососудов в центре и по периферии опухолевой ткани при НМРЛ [24]. Эти специалисты обнаружили, что высокая степень неоваскуляризации в периферической области, но не в центральной была тесно связана с запущенной патологической стадией и плохим прогнозом. Наряду с этим отмечено, что среднее значение плотности микрососудов по периферии было значительно выше при патологической стадии опухолевого процесса II/III, размере опухоли больше 40 мм и наличии метастазов в лимфоузлах ( $p < 0,01$ ). Авторы объясняют наличие корреляции между плотностью периферических микрососудов и метастазированием в лимфоузлы тем фактом, что VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) влияет на проницаемость и пролиферацию эндотелиальных клеток лимфатических сосудов [24], что ранее было показано в исследовании N. Ferrara et al. [25]. Таким образом, ученые пришли к выводу, что степень ангиогенеза на периферии опухоли связана с прогрессированием НМРЛ.

Результаты нашего исследования не противоречат данным зарубежных авторов. Полученные результаты демонстрируют корреляцию между размером опухоли и плотностью кровеносных сосудов микроциркуляторного русла периферической (перитуморозной) зоны но не центральной (интратуморозной) зоны, при плоскоклеточном раке легкого в стадии опухолевого процесса I и II ( $p < 0,05$ ). Также была обнаружена взаимосвязь между плотностью лимфатических сосудов перитуморозной зоны, но не интратуморозной зоны и присутствием метастазов в перибронхиальных лимфатических узлах ( $p < 0,05$ ) при плоскоклеточном раке легкого. Таким образом, полученные данные демонстрируют влияние перитуморозного ангиогенеза на развитие и прогрессирование плоскоклеточного рака легкого и важность изучения особенностей сосудистого микроокружения опухоли для оценки прогноза и решения вопроса о дальнейшей тактике лечения.

## Заключение

Определено, что при плоскоклеточном раке легкого размер опухолевого узла коррелирует с плотностью сосудистого микроокружения в перитуморозной зоне, но не в интратуморозной зоне. Также не выявлена корреляция между плотностью лимфатических сосудов интра- и перитуморозной зон с размером карциномы. В свою очередь, обнаружена взаимосвязь между плотностью перитуморозных лимфатических сосудов и риском развития метастазирования при плоскоклеточной карциноме легкого. Таким образом, особенности сосудистого микроокружения опухоли играют роль в развитии и прогрессировании плоскоклеточной карциномы легкого, и их дальнейшее исследование приведет к лучшему пониманию биологического поведения опухоли, что позволит усовершенствовать тактику лечения данных пациентов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.М. Авдалиян, Д.Н. Проценко, О.В. Зайратьянц.  
Сбор и обработка материала – А.А. Епишкина.  
Написание текста – Е.В. Гребенкин, А.А. Епишкина.  
Редактирование – А.М. Авдалиян, Д.С. Кобяков.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – А.М. Avdalyan, D.N. Protsenko, O.V. Zayratyants.  
Collected the data and performed the analysis – А.А. Epishkina.  
Wrote the paper – Е.В. Grebenkin, А.А. Epishkina.  
Edited the manuscript – А.М. Avdalyan, D.S. Kobayakov.

## Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2020. 239 с.  
AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2019. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020. 239 p. (In Russ.).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Лактионов К.К., Артамонова Е.В., Бредер В.В., Горбунова В.А., Моисеенко Ф.В., Реутова Е.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого. Злокачественные опухоли. 2020;10(3s2-1):40–59. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-02.  
Laktionov KK, Artamonova EV, Breder VV, Gorbunova VA, Moiseenko FV, Reutova EV et al. Practical guidelines for drug treatment of non-small cell lung cancer. *Malignant Tumors.* 2020;10(3s2-1):40–59 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-02.
4. Golding B, Luu A, Jones R, Vilorio-Petit AM. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol Cancer.* 2018;17(1):52. DOI: 10.1186/s12943-018-0810-4.
5. Brahmer JR, Pardoll DM. Immune checkpoint inhibitors: Making immunotherapy a reality for the treatment of lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(2):85–91. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0078.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
7. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4–6. DOI: 10.1093/jnci/82.1.4.
8. Hong S, Tan M, Wang S, Luo S, Chen Y, Zhang L. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(5):909–21. DOI: 10.1007/s00432-014-1862-5.

9. Ellis PM. Anti-angiogenesis in personalised therapy of lung cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;893:91–126. DOI: 10.1007/978-3-319-24223-1\_5.
10. Daum S, Hagen H, Naismith E, Wolf D, Pircher A. The role of anti-angiogenesis in the treatment landscape of non-small cell lung cancer – new combinational approaches and strategies of neovessel inhibition. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:610903. DOI: 10.3389/fcell.2020.610903.
11. Wang F, Wang S, Zhou Q. The resistance mechanisms of lung cancer immunotherapy. *Front Oncol.* 2020;10:568059. DOI: 10.3389/fonc.2020.568059.
12. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38(12):1564–79. DOI: 10.1016/s0959-8049(02)00094-1.
13. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018;553(7689):446–54. DOI: 10.1038/nature25183.
14. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(16):10931–4. PMID: 1375931.
15. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: A quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst.* 1972;48:347–56. PMID: 4347034.
16. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: Microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(12):883–93. DOI: 10.1093/jnci/94.12.883.
17. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology.* 2000;36(4):306–12. DOI: 10.1046/j.1365-2559.2000.00850.x.
18. Borre M, Offersten BV, Nerström B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer.* 1998;78(7):940–4. DOI: 10.1038/bjc.1998.605.
19. Bing Z, Jian-ru Y, Yao-quan J, Shi-feng C. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung carcinoma by CD34 immunohistochemistry. *Cell Biochem Biophys.* 2014;70(1):327–31. DOI: 10.1007/s12013-014-9916-5.
20. Sun C, Li J, Wang B, Shangguan J, Figini M, Shang N et al. Tumor angiogenesis and bone metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma. *J Immunol Methods.* 2018;452:46–52. DOI: 10.1016/j.jim.2017.10.006.
21. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 1992;340(8812):6145–6. DOI: 10.1016/0140-6736(92)93217-b.
22. Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2002;87(7):694–701. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600551.
23. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG et al. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res.* 1993;53(18):4161–3. PMID: 7689928.
24. Ushijima C, Tsukamoto S, Yamazaki K, Yoshino I, Sugio K, Sugimachi K. High vascularity in the peripheral region of non-small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression. *Lung Cancer.* 2001;34(2):233–41. DOI: 10.1016/s0169-5002(01)00246-x.
25. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4–25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.

### Информация об авторах

Анна Алексеевна Епишкина – врач-патологоанатом ММКЦ «Коммунарка».

Ашот Меружанович Авдальян – доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением ММКЦ «Коммунарка».

Евгений Валерьевич Гребенкин – врач-патологоанатом ММКЦ «Коммунарка».

Дмитрий Сергеевич Кобыяков – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом Когалымской городской больницы.

Денис Николаевич Проценко – кандидат медицинских наук, главный врач ММКЦ «Коммунарка».

Олег Вадимович Зайратьянц – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

### Author information

Anna A. Epishkina – Pathologist, Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”.  
<https://orcid.org/0000-0002-7824-7949>

Ashot M. Avdalyan – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”.  
<https://orcid.org/0000-0002-2229-1713>

Evgeny V. Grebenkin – Pathologist, Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”.  
<https://orcid.org/0000-0002-4990-6722>

Dmitry S. Kobayakov – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Kogalym City Hospital.  
<https://orcid.org/0000-0001-5321-7113>

Denis N. Protsenko – Cand. Sci. (Med.), Chief Physician, Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka”.  
<https://orcid.org/0000-0002-5166-3280>

Oleg V. Zayratyants – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry.  
<https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

## Экспрессия PIBF в гравидарном эндометрии при репродуктивных потерях первого триместра после экстракорпорального оплодотворения

Т.Г. Траль<sup>1,2</sup>, Г.Х. Толибова<sup>1,3</sup>, И.Ю. Коган<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** *Введение.* Демографический спад является главным вызовом современному обществу, и в данном контексте проблема репродуктивных потерь первого триместра сохраняет медико-социальное значение независимо от способа наступления беременности. Эндометрий продолжает оставаться недооцененным звеном репродукции, при этом исследования гравидарного эндометрия малочисленны и фрагментарны. Цель исследования – оценка экспрессии прогестерониндуцированного блокирующего фактора (progesterone-induced blocking factor, PIBF) в гравидарном эндометрии при репродуктивных потерях первого триместра после применения методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

*Материалы и методы.* Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проведено на 77 образцах abortивного материала с нормальным кариотипом ворсин хориона при неразвивающейся беременности 5–8 недель эмбриогистологического срока после ЭКО и 15 образцах abortивного материала прогрессирующей беременности на аналогичных сроках. Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию PIBF в железах и строме компактного слоя гравидарного эндометрия. *Результаты.* Морфологические особенности неразвивающейся беременности после ЭКО характеризуются нарушением трансформации и децидуализации гравидарного эндометрия. Посредством иммуногистохимического исследования было показано снижение экспрессии PIBF независимо от вариантов трансформации эндометрия по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ), что, вероятно, является отражением имплантационной и гравидарной несостоятельности эндометрия.

*Заключение.* Комплексное морфологическое исследование abortивного материала с оценкой экспрессии PIBF позволит верифицировать нарушение трансформационного потенциала желез и стромы гравидарного эндометрия при ранних репродуктивных потерях независимо от способа наступления беременности.

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность, бесплодие, ЭКО, прогестерониндуцированный блокирующий фактор, гравидарная трансформация эндометрия

**Для корреспонденции:** Татьяна Георгиевна Траль. E-mail: ttg.tral@yandex.ru

**Для цитирования:** Траль Т.Г., Толибова Г.Х., Коган И.Ю. Экспрессия PIBF в гравидарном эндометрии при репродуктивных потерях первого триместра после экстракорпорального оплодотворения. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):63–70. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.63-70.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках фундаментального научного исследования № 1021062512052-5-3-2.2 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

Статья поступила 27.01.2022. Получена после рецензирования 21.02.2022. Принята в печать 28.02.2022.

## PIBF expression in the gravid endometrium in early pregnancy loss following assisted reproductive technologies

T.G. Tral<sup>1,2</sup>, G.Kh. Tolibova<sup>1,3</sup>, I.Yu. Kogan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Demographic decline is one of the main challenges to modern society. Thus, the problem of early pregnancy loss retains medical and social significance regardless of the way of conception. The endometrium continues to be an underestimated component in the reproduction process, while studies of

the gravid endometrium are few. The aim of the paper was to evaluate expression of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the gravid endometrium in early pregnancy loss following IVF methods.

**Materials and methods.** Histological and immunohistochemical studies were carried out on samples of products of conception (POCs). Seventy-seven POCs with normal chorionic villi karyotype were collected from women with missed miscarriage of 5–8 weeks of embryohistological term after IVF; the other 15 samples of elective POCs were collected at the same term. We evaluated PIBF expression in glands and stroma of the gravid endometrium compact layer using immunohistochemical method.

**Results.** Morphological features of missed miscarriage after IVF were characterized by violated transformation and decidualization of the gravid endometrium. Immunohistochemistry showed decreased PIBF expression in the experimental groups regardless of endometrial transformation options. It might indicate disturbances in the gravid endometrium and implantation compared to the control group ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** A comprehensive morphological evaluation of POCs with PIBF expression assessment will allow to verify violation of transformational potential of glands and stroma of the gravid endometrium in cases of early pregnancy loss regardless of the way of conception.

**Keywords:** missed abortion, infertility, IVF, progesterone-induced blocking factor, gravid transformation of the endometrium

**Corresponding author:** Tatyana G. Tral. E-mail: ttg.tral@yandex.ru

**For citation:** Tral T.G., Tolibova G.Kh., Kogan I.Yu. PIBF expression in the gravid endometrium in early pregnancy loss following assisted reproductive technologies. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):63–70 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.63-70.

**Funding.** The work was carried out within the framework of the Fundamental Scientific Research No. 1021062512052-5-3.2.2 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

**Received** 27.01.2022. **Received in revised form** 21.02.2022. **Accepted** 28.02.2022.

## Введение

В современной репродуктивной медицине главная триада – бесплодие, невынашивание беременности и неэффективные циклы ЭКО – формирует актуальной вектор направления научных и практических исследований в этой области. За последнее 50 лет структура репродуктивных потерь принципиально не изменилась, а мультифакторность и поликаузальность доказаны многочисленными исследованиями [1–5].

На фоне революционных успехов в эмбриологии последних лет, а именно предимплантационной генетической диагностики, использования искусственно интеллект при оценке эмбриона, а также создания бластоидов и эмбрионов из стволовых клеток изучение эндометрия как главной доминанты и детерминанты, несмотря на многочисленные исследования, так и остается дискуссионным [6–15].

Истинная доля клинических потерь беременности неизвестна, однако и выявление причин неразвивающейся беременности первого триместра при отсутствии комплексного клинко-морфологического и цитогенетических исследований также неоднозначно.

Эндометрий продолжает оставаться недооцененным звеном репродукции, и многочисленные исследования не улучшают эффективность протоколов ЭКО, а исследования гравидарного эндометрия малочисленны и фрагментарны [16]. Показано, что полноценность гравидарной трансформации эндометрия основана на балансе циклических изменений и имплантационных свойств эндометрия, иммунологического компонента, микробиологического и биохимического микроокруже-

ния для его эффективного взаимоотношения с бластоцистой [17–20].

Следует отметить, что иммунологический фактор в генезе репродуктивных потерь, в том числе при использовании технологий ЭКО, остается не до конца ясным в связи со множественными механизмами иммунологических взаимодействий в системе мать–плацента–плод. Особая роль отводится PIBF (progesterone-induced-blocking factor) – прогестерониндуцированному блокирующему фактору, который участвует в секреторной трансформации и децидуализации эндометрия.

В экспериментальных исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что PIBF оказывает иммуномодулирующее действие на имплантационные характеристики эндометрия, формируя иммунологическое окружение в зоне имплантации. Экспрессия PIBF достигает максимальных значений в ядрах и цитоплазме стромальных и эпителиальных клеток матки во время окна имплантации и децидуализированных стромальных клетках [21–23]. При наступлении беременности синтез PIBF увеличивается не только в клетках эндометрия, но и в клетках трофобласта, а также самого эмбриона, обеспечивая регуляторные механизмы инвазии трофобласта [24].

PIBF способствует блокировке синтеза простагландинов и перфорина в клетках гравидарного эндометрия и инактивирует токсическое влияние НК-клеток на развитие эмбриона. PIBF индуцирует Т-хелперный цитокиновый ответ после оплодотворения, обеспечивая положительный сдвиг в сторону Th-2 типа воспаления



путем увеличения синтеза противовоспалительных интерлейкинов IL-3, IL-4 и IL-10 и снижения выработки провоспалительных цитотоксических цитокинов, в частности интерферона (IFN- $\delta$ ), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкина-2 (IL-2) [25, 26].

По мнению ряда авторов, PIBF участвует в подготовке эндометрия к беременности, непосредственно к полноценной инвазии трофобласта и моделированию иммунологического баланса в зоне имплантации, и изменение уровня маркера в моче и крови беременных служит предиктором ранних потерь беременности [27, 28].

Исследование PIBF в гравидарном эндометрии может дополнить клинические данные о течении беременности и рисках репродуктивных потерь у пациенток разных групп, в частности при применении протоколов ЭКО.

## Материалы и методы

### Гистологическое исследование

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проведено на 77 образцах абортивного материала с нормальным кариотипом ворсин хориона при неразвивающейся беременности 5–8 недель после ЭКО (пять групп) и 15 образцах абортивного материала после прерывания беременности (хирургическим путем) по желанию женщины (контрольная группа) на аналогичном сроке, поступивших в отдел патоморфологии НИИ АГиР им. Д.О. Отта.

По результатам гистологического исследования впервые верифицированы пять вариантов гравидарной трансформации стромы и желез эндометрия при неразвивающейся беременности после ЭКО, которые подробно представлены в [29]:

- I группа – полноценная гравидарная трансформация стромы и желез эндометрия (n=20);
- II группа – полноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа (n=15);
- III группа – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа (n=15);
- IV группа – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами пролиферативного типа (n=15);
- V группа – неполноценная секреторная трансформация с железами секреторного и пролиферативного типа (n=12).

### Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили на абортивном материале, полученном при гистологической проводке в гистопроцессоре Leica TP1020 (Leica, Германия), залитом в парафин на приборе модульной системы заливки TES 99 (Medite, Германия). Иммуногистохимический метод исследования включал качественную и количественную оценку экспрессии

прогестерониндуцированного блокирующего фактора с использованием первичных поликлональных кроличьих антител к рецепторам Anti-PIBF – клон ab 151491 в стандартном разведении (1:200) производства Abcam (Великобритания). В качестве системы визуализации использовали Abcam Mouse and Rabbit Specific HRP Plus (ABC) Detection IHC Kit (RTU) – клон ab93697 (Abcam, Великобритания). Визуализацию экспрессии данного маркера проводили на микроскопе Olympus BX46 (Olympus, Япония) и с использованием программного обеспечения CellSens 47 Entry (Olympus, Япония). Экспрессию изучаемого маркера рассчитывали с помощью программы «ВидеоТест-Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия) в 10 полях зрения при  $\times 400$ .

### Статистический анализ данных

Обработка статистического материала проводилась в программе SPSSV.23.0 (IBM, США). Параметры распределения в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде среднего и 95% доверительного интервала – M (95% ДИ). Для определения статистически значимых различий между количественными параметрами нормально распределенных данных исследуемых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с расчетом 95% ДИ. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что экспрессия PIBF верифицируется в железах и строме компактного слоя эндометрия. Максимальная экспрессия данного маркера верифицирована в эндометрии контрольной группы (рис. 1 А, В).

В основных группах независимо от вариантов гравидарной трансформации эндометрия (полноценная, неполноценная) отмечено достоверное снижение экспрессии PIBF в железах компактного слоя по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Необходимо отметить, что в I группе при полноценной гравидарной трансформации стромы и желез эндометрия также отмечено достоверное снижение экспрессии по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,0001$ ), что свидетельствует об изменении иммунологического баланса в полноценном гравидарном эндометрии после ЭКО (рис. 2 А, В).

При сравнении экспрессии данного маркера во II группе при полноценной гравидарной трансформации стромы с железами секреторного типа верифицирована статистически значимая высокая экспрессия по сравнению с IV группой при неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами пролиферативного типа ( $p < 0,0001$ ).

При неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами секреторного типа (III группа) выявлена достоверно высокая экспрессия данного маркера по сравнению с IV группой при неполноцен-

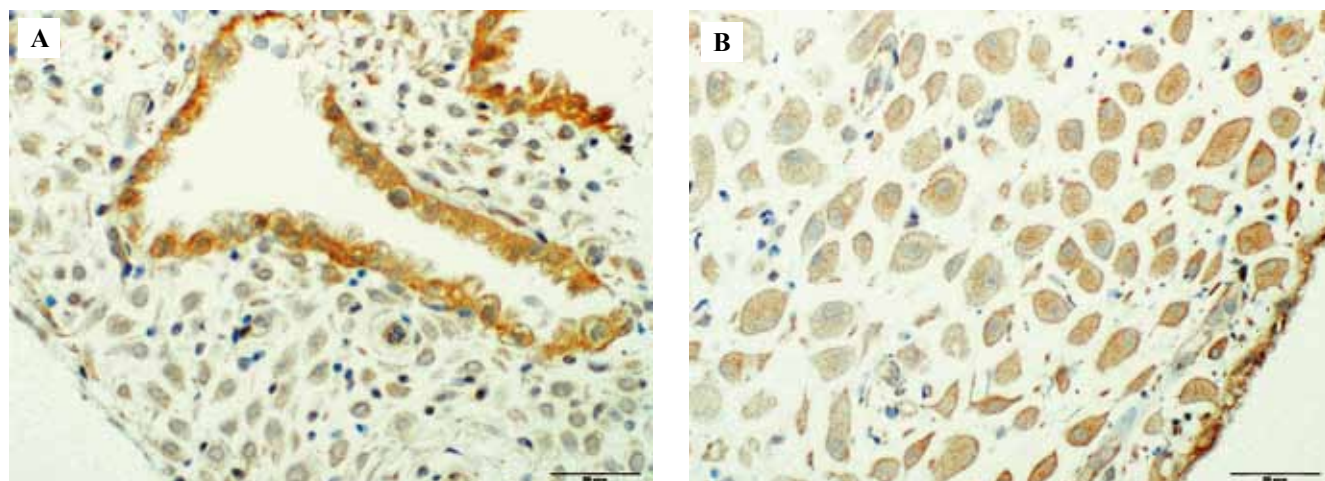


Рис. 1. Экспрессия PIBF в железах (А) и строме (В) в гравидарном эндометрии контрольной группы. ИГХ с антителами к анти-PIBF,  $\times 400$

Fig. 1. PIBF expression in glands (A) and stroma (B) of decidualized endometrium of the control group. Staining with anti-PIBF antibodies,  $\times 400$

Таблица 1 | Table 1

Экспрессия PIBF в железах гравидарного эндометрия, М (95% ДИ) |  
PIBF expression in glands of decidualized endometrium, M (95% CI)

Группы   Groups	Среднее значение   Average meaning	95% ДИ для среднего значения   95% CI for the mean value		F-тест   F-test	Р-значение   p-value
		нижняя граница   lower bound	верхняя граница   upper bound		
Контрольная группа   Control group (n=15)	24,12	22,63	25,61	28,958	$p^{k-1} < 0,0001$ $p^{k-2} < 0,0001$ $p^{k-3} < 0,0001$ $p^{k-4} < 0,0001$ $p^{k-5} < 0,0001$
I группа   Group I (n=20)	14,34	12,84	15,83		$p^{1-2} = 0,070$ $p^{1-3} = 1,000$ $p^{1-4} = 0,201$ $p^{1-5} = 1,000$
II группа   Group II (n=15)	17,59	15,43	19,75		$p^{2-3} = 0,070$ $p^{2-4} < 0,0001$ $p^{2-5} = 0,002$
III группа   Group III (n=15)	15,34	13,28	17,40		$p^{3-1} < 0,070$ $p^{3-2} = 1,000$ $p^{3-4} < 0,0001$ $p^{3-5} = 0,002$
IV группа   Group IV (n=15)	11,89	10,83	12,94		$p^{4-1} = 0,201$ $p^{4-2} < 0,0001$ $p^{4-3} = 0,041$ $p^{4-5} = 1,000$
V группа   Group V (n=12)	13,04	11,34	14,73		$p^{5-1} = 1,000$ $p^{5-2} < 0,002$ $p^{5-3} = 1,000$ $p^{5-4} = 1,000$

ной гравидарной трансформации стромы с железами пролиферативного типа ( $p < 0,0001$ ). Экспрессия PIBF в IV группе имела мультифокальное распределение и была достоверно ниже по сравнению со всеми группами, в том числе контрольной.

Внутригрупповое сравнение экспрессии PIBF выявило достоверное снижение в V группе при неполноценной гравидарной трансформации с железами секреторного и пролиферативного типа по сравнению с II группой при наличии желез секреторного типа

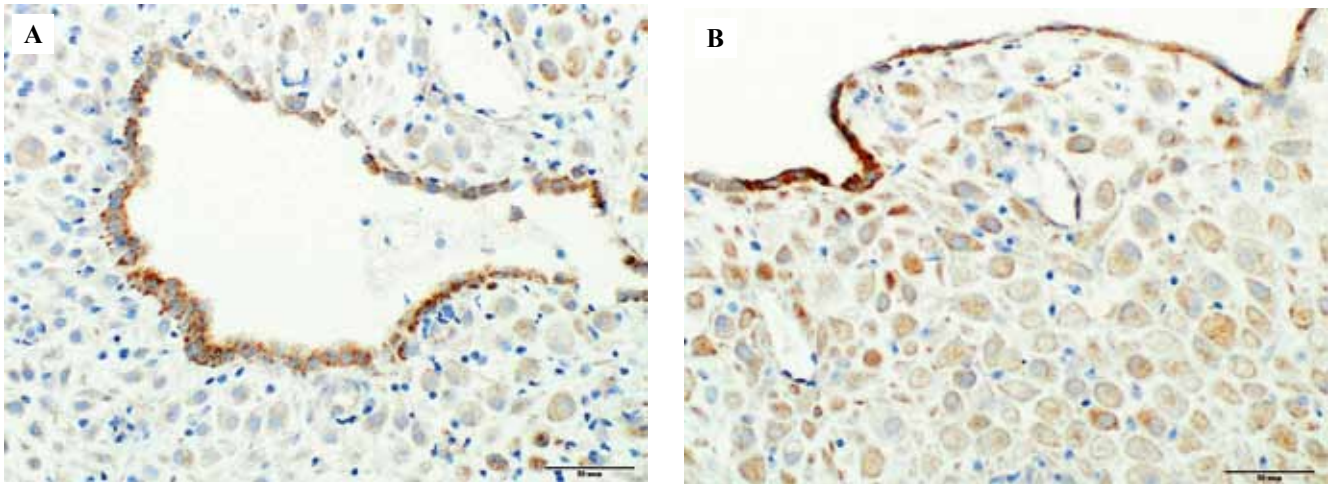


Рис. 2. Экспрессия PIBF в железах (А) и строме (В) в гравидарном эндометрии I группы. ИГХ с антителами к анти-PIBF,  $\times 400$   
 Fig. 2. PIBF expression in glands (A) and stroma (B) of decidualized endometrium of group I. Staining with anti-PIBF antibodies,  $\times 400$

Таблица 2 | Table 2

Экспрессия PIBF в строме гравидарного эндометрия, М (95% ДИ) |  
 PIBF expression in the stroma of decidualized endometrium, M (95% CI)

Группы   Groups	Среднее значение   Average meaning	95% ДИ для среднего значения   95% CI for the mean value		F-тест   F-test	P-значение   p-value
		нижняя граница   lower bound	верхняя граница   upper bound		
Контрольная группа (n=15)	31,52	29,89	33,15	28,958	$p^{k-1} < 0,0001$ $p^{k-2} < 0,0001$ $p^{k-3} < 0,0001$ $p^{k-4} < 0,0001$ $p^{k-5} < 0,0001$
I группа   Group I (n=20)	20,63	18,80	22,45		$p^{1-2} < 0,001$ $p^{1-3} = 1,000$ $p^{1-4} = 0,035$ $p^{1-5} < 0,001$
II группа   Group II (n=15)	11,59	10,37	12,82		$p^{2-1} < 0,0001$ $p^{2-3} < 0,0001$ $p^{2-4} < 0,0001$ $p^{2-5} = 0,061$
III группа   Group III (n=15)	18,28	15,96	20,59		$p^{3-1} = 1,000$ $p^{3-2} < 0,0001$ $p^{3-4} = 1,000$ $p^{3-5} = 0,168$
IV группа   Group IV (n=15)	16,87	15,08	18,66		$p^{4-1} = 0,035$ $p^{4-2} < 0,0001$ $p^{4-3} = 1,000$ $p^{4-5} = 1,000$
V группа   Group V (n=12)	14,96	13,56	16,36		$p^{5-1} < 0,001$ $p^{5-2} = 0,061$ $p^{5-3} = 0,168$ $p^{5-4} = 1,000$

( $p < 0,002$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что полноценная секреторная трансформация железистого компонента эндометрия наряду с оптимальными показателями рецепторного профиля является необходимым компонентом для подготовки эндометрия к наступлению и развитию беременности.

При верификации экспрессии PIBF в стромальном компоненте компактного слоя гравидарного эндометрия выявлено достоверное снижение экспрессии в основных группах по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Можно полагать, что снижение экспрессии PIBF при неразвивающейся беременности после применения

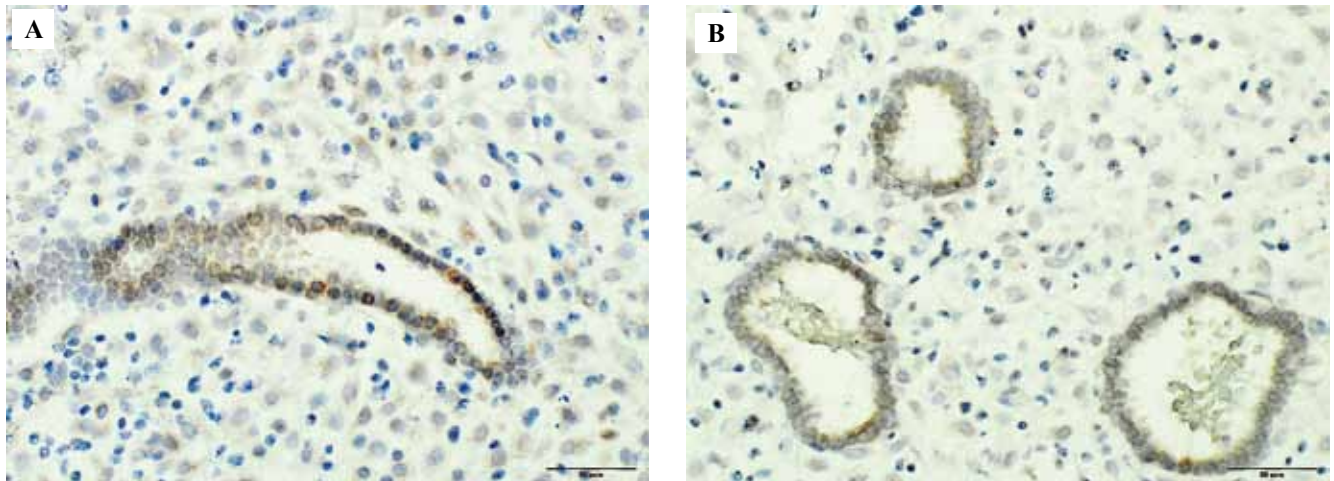


Рис. 3. Экспрессия PIBF в строме гравидарного эндометрия II группы (А) и V группы (В). ИГХ с антителами к анти-PIBF,  $\times 400$   
 Fig. 3. PIBF expression in stroma of the decidualized endometrium of group II (A) and group V (B). Staining with anti-PIBF antibodies,  $\times 400$

методов ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным фактором связано с исходным состоянием эндометрия. Известно, что наличие эндометриальной дисфункции у данных пациенток приводит к нарушению имплантации и плацентации, развитию хориона и эмбриона. Несмотря на моделирование цикла и гормональную поддержку беременности, формирование полноценной гравидарной трансформации не является гарантией последующего прогрессирования беременности (рис. 3 А, В).

Представленные в таблице 2 данные демонстрируют, что при неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами пролиферативного типа (IV группа) и неполноценной гравидарной трансформации с железами секреторного и пролиферативного типа (V группа) экспрессия прогестерониндуцированного блокирующего фактора была в 2 раза ниже по сравнению с контрольной группой и не имела статистических отличий внутри групп, что, вероятно, связано с нарушением секреторной и гравидарной дифференцировки клеток стромы эндометрия.

### Обсуждение

Результаты морфологического исследования гравидарного эндометрия указывают, что достоверное снижение и нарушение экспрессии прогестерониндуцированного блокирующего фактора при неразвивающейся беременности после ЭКО и нормальном кариотипе абортуса связано с дисбалансом рецепторного профиля и нарушением морфофункционального состояния исходного и гравидарного эндометрия. Несмотря на сходные морфологические характеристики гравидарного эндометрия после ЭКО I группы с полноценной гравидарной трансформацией стромы и желез эндометрия и II группы с полноценной гравидарной трансформацией стромы и железами секреторного типа, отмечается достоверное снижение PIBF в строме эндометрия

II группы, что может свидетельствовать о нарушениях на молекулярном уровне. Выявленные изменения экспрессии данного маркера в abortивном материале после ЭКО указывают на его вероятную значимость в генезе нарушения гравидарной трансформации и ранних репродуктивных потерях. Следует констатировать, что отсутствие исследований PIBF в гравидарном эндометрии abortивного материала при естественно наступившей беременности и беременности после ЭКО не позволяет обсудить и сопоставить полученные данные с результатами других исследований.

Важность участия PIBF в репродукции подтверждают данные литературы. Так, PIBF участвует в формировании децидуальной оболочки и восприимчивости эндометрия, что было показано в культуре клеток [30]. Кроме того, с помощью иммуногистохимического исследования установлено, что во время периимплантационного периода экспрессия PIBF присутствует в месте имплантации на 4–5-й день беременности, достигая максимальных значений в ядрах и цитоплазме стромальных и эпителиальных клеток матки во время окна имплантации и децидуализированных стромальных клетках, что позволяет высказать мнение о роли PIBF как факторе, необходимом для имплантации. В своих исследованиях В. Mulac-Jericevic et al. показывают, что ряд прогестационных эффектов прогестерона опосредуется PIBF, подтверждая, что он может играть роль в процессе имплантации [31].

### Заключение

Применение комплексного гистологического и иммуногистохимического исследования abortивного материала с верификацией вариантов трансформации и оценкой экспрессии прогестерониндуцированного блокирующего фактора позволяет определить его роль в прегравидарной и гравидарной трансформации, а также в развитии наступившей беременности. Полученные

результаты могут быть использованы в клинической практике как дополнительный метод для верификации причин репродуктивных потерь.

#### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова, И.Ю. Коган.

Сбор и обработка материала – Т.Г. Траль.

Написание текста – Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова.

Редактирование – Г.Х. Толибова, И.Ю. Коган.

#### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.G. Tral, G.Kh. Tolibova, I.Yu. Kogan.

Collected the data and performed the analysis – T.G. Tral.

Wrote the paper – T.G. Tral, G.Kh. Tolibova.

Edited the manuscript – G.Kh. Tolibova, I.Yu. Kogan.

#### Литература/References

1. В.Е. Радзинский (ред.). Неразвивающаяся беременность. 3-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 184 с.  
VE Radzinsky (ed.). Anembryonic pregnancy. 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 184 p. (In Russ.).
2. Gong G, Yin C, Huang Y, Yang Y, Hu T, Zhu Z et al. A survey of influencing factors of missed abortion during the two-child peak period. *J Obstet Gynaecol.* 2021;41(6):977–80. DOI: 10.1080/01443615.2020.1821616.
3. Serdinšek T, Reljič M, Kovač V. Medical management of first trimester missed miscarriage: The efficacy and complication rate. *J Obstet Gynaecol.* 2019;39(5):647–51. DOI: 10.1080/01443615.2018.1535577.
4. Barrientos G, Pussetto M, Rose M, Staff AC, Blois SM, Toblli JE. Defective trophoblast invasion underlies fetal growth restriction and preeclampsia-like symptoms in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Mol Hum Reprod.* 2017;23(7):509–19. DOI: 10.1093/molehr/gax024.
5. Богданова И.М., Болтовская М.Н. Естественная селекция эмбрионов человека: иммунные механизмы контроля качества. *Иммунология.* 2019;40(1):68–73. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-110084.  
Bogdanova IM, Boltovskaya MN. Natural selection of human embryos: immune mechanisms of quality control. *Immunologiya = Immunology.* 2019;40(1):68–73 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-110084.
6. James K, Bhartiya D, Ganguly R, Kaushik A, Gala K, Singh P et al. Gonadotropin and steroid hormones regulate pluripotent very small embryonic-like stem cells in adult mouse uterine endometrium. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):83. DOI: 10.1186/s13048-018-0454-4.
7. Liu X, Tan JP, Schröder J, Aberkane A, Ouyang JF, Mohenska M et al. Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature.* 2021;591(7851):627–32. DOI: 10.1038/s41586-021-03372-y.
8. Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature.* 2021;591(7851):620–6. DOI: 10.1038/s41586-021-03356-y.
9. Li R, Zhong C, Yu Y, Liu H, Sakurai M, Yu L et al. Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures. *Cell.* 2019;179(3):687–702.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2019.09.029.
10. Chen D, Sun N, Hou L, Kim R, Faith J, Aslanyan M et al. Human primordial germ cells are specified from lineage-primed progenitors. *Cell Rep.* 2019;29(13):4568–4582.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.11.083.
11. Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A, Guo G. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell.* 2021;28(6):1016–1022.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2021.04.031.
12. Fu J, Warmflash A, Lutolf MP. Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation. *Nat Mater.* 2021;20(2):132–44. DOI: 10.1038/s41563-020-00829-9.
13. Sozen B, Amadei G, Cox A, Wang R, Na E, Czukiewska S et al. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures. *Nat Cell Biol.* 2018;20(8):979–89. DOI: 10.1038/s41556-018-0147-7.
14. Оразов М.Р., Михалева Л.М., Семенов П.А. Хронический эндометрит: патогенез, диагностика, лечение и его связь с бесплодием. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2020;9(2):16–25. DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.16-25.  
Orazov MR, Mikhaleva LM, Semenov PA. Chronic endometritis: pathogenesis, diagnosis, treatment and its connection with infertility. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(2):16–25 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.16-25.
15. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T et al. Natural selection of human embryos: Impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2010;5(4):e10287. DOI: 10.1371/journal.pone.0010287.
16. Малышкина А.И., Батрак Н.В., Перетятко Л.П., Добрынина М.Л. Клинико-лабораторные и морфологические различия неразвивающейся беременности и самопроизвольного аборта в ранние сроки беременности. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2021;21(1):31–37. DOI: 10.17116/rosakush20212101131.  
Malyschkina AI, Batrak NV, Peretyatko LP, Dobrynina ML. Clinical and morphological differences in non-developing pregnancy and spontaneous abortion in early pregnancy. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist.* 2021;21(1):31–37 (In Russ.). DOI: 10.17116/rosakush20212101131.
17. Puente E, Alonso L, Laganà AS, Ghezzi F, Casarin J, Carugno J. Chronic endometritis: Old problem, novel insights and future challenges. *Int J Fertil Steril.* 2020;13(4):250–6. DOI: 10.22074/ijfs.2020.5779.
18. Богданова И.М., Артемьева К.А., Болтовская М.Н. Развитие и функция регуляторных В-клеток и их роль в поддержке беременности. *Иммунология.* 2021;42(4):415–425. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-415-425.  
Bogdanova IM, Artemyeva KA, Boltovskaya MN. Development and function of regulatory B cells and its role in pregnancy support. *Immunologiya = Immunology.* 2021;42(4):415–425 (In Russ.). DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-415-425.
19. Shah NM, Lai PF, Imami N, Johnson MR. Progesterone-related immune modulation of pregnancy and labor. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:198. DOI: 10.3389/fendo.2019.00198.

20. Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Михалева Л.М., Силантьева Е.С., Семенов П.А., Лагутина Е.В. и др. Предикторы неудач ЭКО при имплантационной несостоятельности эндометрия. Трудный пациент. 2021;19(1):23–26. DOI: 10.24412/2074-1995-2021-1-23-26.  
*Radzinsky VE, Orazov MR, Mihaleva LM, Silantyeva ES, Semenov PA, Lagutina EV et al.* Predictors of IVF failures in implantation failure of the endometrium. *Difficult Patient*. 2021;19(1):23–26 (In Russ.). DOI: 10.24412/2074-1995-2021-1-23-26.
21. Szekeres-Bartho J, Šučurović S, Mulac-Jeričević B. The role of extracellular vesicles and PIBF in embryo-maternal immune-interactions. *Front Immunol*. 2018;9:2890. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02890.
22. Pallinger E, Bogнар Z, Bogdan A, Csabai T, Abraham H, Szekeres-Bartho J. PIBF<sup>+</sup> extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8<sup>+</sup> cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):4662. DOI: 10.1038/s41598-018-23112-z.
23. Mulac-Jeričević B, Šučurović S, Gulic T, Szekeres-Bartho J. The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 2019;81(5):e13104. DOI: 10.1111/aji.13104.
24. Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arató G et al. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol*. 2011;90(1):50–7. DOI: 10.1016/j.jri.2011.03.005.
25. Bogdan A, Berta G, Szekeres-Bartho J. PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol*. 2017;119:38–43. DOI: 10.1016/j.jri.2016.12.001.
26. Szekeres-Bartho J, Šučurović S, Mulac-Jeričević B. The Role of Extracellular vesicles and PIBF in embryo-maternal immune-interactions. *Front Immunol*. 2018;9:2890. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02890.
27. Hudić I, Stray-Pedersen B, Szekeres-Bartho J, Fatušić Z, Dizdarević-Hudić L, Tomić V et al. Maternal serum progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the prediction of preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2015;109:36–40. DOI: 10.1016/j.jri.2015.02.006.
28. Hudic I, Szekeres-Bartho J, Vrtacnik EB, Virant Klun I, Brkic S, Frangez HB et al. Progesterone induced blocking factor (PIBF) taken in early pregnancy predicts the pregnancy outcome in women undergoing in vitro fertilization procedure. *J Reprod Immunol*. 2020;140:103150. DOI: 10.1016/j.jri.2020.103150.
29. Траль Т.Г., Толибова Г.Х. Морфологические варианты гравидарной трансформации эндометрия при неразвивающейся беременности после экстракорпорального оплодотворения. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(S4):42–51. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.42-51.  
*Tral TG, Tolibova GK.* Morphological variants of decidual endometrial transformation in missed abortion after in vitro fertilization. *Clinical and experimental morphology*. 2021;10(S4):42–51 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.42-51.
30. Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-regulated endometrial Factors controlling implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):237–45. DOI: 10.1111/aji.12473.
31. Mulac-Jeričević B, Šučurović S, Gulic T, Szekeres-Bartho J. The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 2019;81(5):e13104. DOI: 10.1111/aji.13104.

### Информация об авторах

Татьяна Георгиевна Траль – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммуногистохимии патологоанатомического отделения НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, доцент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Гулрухсор Хайбуллоевна Толибова – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующая отделом патоморфологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, доцент кафедры акушерства и гинекологии имени С.Н. Давыдова Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова.

Игорь Юрьевич Коган – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта.

### Author information

Tatyana G. Tral – Cand. Sci. (Med.), Head of the Immunohistochemistry Laboratory of the Pathology Department, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with course of Forensic Medicine, St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0001-8948-4811>

Gulrukhsor Kh. Tolibova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Head of the Pathomorphology Department, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, S.N. Davydov Department of Obstetrics and Gynecology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0002-6216-6220>

Igor Yu. Kogan – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology.  
<https://orcid.org/0000-0002-7351-6900>

## Изменения легких при сочетании ВИЧ-инфекции и COVID-19

Ю.Г. Пархоменко<sup>1,5</sup>, А.Л. Черняев<sup>2,3,5</sup>, П.А. Ведяпин<sup>1</sup>, Н.В. Мозгалева<sup>1</sup>, Ж.Р. Омарова<sup>2</sup>,  
О.А. Тишкевич<sup>1</sup>, Е.А. Гомзикова<sup>1</sup>, М.В. Самсонова<sup>3,4</sup>, А.С. Жиленкова<sup>6</sup>, Ю.С. Лебедин<sup>7</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

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

<sup>3</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>6</sup> Московский городской центр профилактики и борьбы со СПИДом Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>7</sup> ООО «ХЕМА», Москва, Россия

**Резюме.** Пандемия COVID-19 является важной медико-социальной проблемой в мире. Информация по течению данной инфекции среди уязвимых подгрупп населения, например, таких, как иммунокомпрометированные пациенты, довольно ограничена. Вследствие этого интерес многих исследователей направлен на изучение течения COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов. В статье представлен клинический случай ВИЧ-инфицированного пациента 60 лет с поражением легких, вызванным сочетанием действия SARS-CoV-2, вируса герпеса 6-го типа, цитомегаловируса и пневмоциста, с развитием тяжелой фатальной респираторной недостаточности.

**Ключевые слова:** COVID-19, ВИЧ, SARS-CoV-2, вирус герпеса, цитомегаловирус, пневмоциста, патологическая анатомия

**Для корреспонденции:** Мария Викторовна Самсонова. E-mail: samary@mail.ru

**Для цитирования:** Пархоменко Ю.Г., Черняев А.Л., Ведяпин П.А., Мозгалева Н.В., Омарова Ж.Р., Тишкевич О.А., Гомзикова Е.А., Самсонова М.В., Жиленкова А.С., Лебедин Ю.С. Изменения легких при сочетании ВИЧ-инфекции и COVID-19. Клинический эксперимент. морфология. 2022;11(2):71–77. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.71-77.

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

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

Статья поступила 03.03.2022. Получена после рецензирования 21.03.2022. Принята в печать 25.04.2022.

## Lung changes in a patient with combination of HIV infection and COVID-19

Yu.G. Parkhomenko<sup>1,5</sup>, A.L. Chernyaev<sup>2,3,4,5</sup>, P.A. Vedyapin<sup>1</sup>, N.V. Mozgaleva<sup>1</sup>, Zh.R. Omarova<sup>2</sup>,  
O.A. Tishkevich, E.A. Gomzikova<sup>1</sup>, M.V. Samsonova<sup>3,4</sup>, A.S. Zhilenkova<sup>6</sup>, Yu.S. Lebedin<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Infectious Clinical Hospital No. 2 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

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

<sup>3</sup> Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>5</sup> A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

<sup>6</sup> Moscow City AIDS Prevention and Treatment Centre, Moscow, Russia

<sup>7</sup> XEMA Company Limited, Moscow, Russia

**Abstract.** The COVID-19 pandemic is now a global medical and social problem. Little is known about COVID-19 impact on some vulnerable subgroups, such as immunocompromised patients. Therefore, scientists worldwide show interest in studying the impact of SARS-CoV-2 infection on HIV-positive individuals. We report an autopsy clinical case of a deceased 60-year-old HIV-infected patient with lung damage caused by a combination of the SARS-CoV-2 virus, human herpesvirus 6, cytomegalovirus, and pneumocystis with severe fatal respiratory failure.

**Keywords:** COVID-19, HIV, SARS-CoV-2, herpes virus, cytomegalovirus, pneumocystis, pathological anatomy

**Corresponding author:** Maria V. Samsonova. E-mail: samary@mail.ru

**For citation:** Parkhomenko Yu.G., Chernyaev A.L., Vedyapin P.A., Mozgaleva N.V., Omarova Zh.R., Tishkevich O.A., Gomzikova E.A., Samsonova M.V., Zhilenkova A.S., Lebedin Yu.S. A contemporary issue: the combination of HIV infection and COVID-19. *Clin. exp. morphology*. 2022;11(2):71–77 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.71-77.

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

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

**Received** 03.03.2022. **Received in revised form** 21.03.2022. **Accepted** 25.04.2022.

## Введение

Как известно, ВИЧ-инфекция представляет собой одну из глобальных медико-эпидемиологических и социально-экономических проблем. Согласно данным Объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИДу (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS), по состоянию на 2020 год в мире насчитывалось порядка 37,7 миллиона (30,2–45,1 миллиона) ВИЧ-инфицированных, около 680 тысяч (от 480 тысяч до 1 миллиона) из которых умерли от СПИД-ассоциированных заболеваний [1]. Безусловно, приведенные данные не отражают ситуацию во всей полноте и во многом зависят от охвата населения каждой страны скрининговыми программами тестирования, в связи с чем часть пациентов остается в серой зоне вплоть до развития финальной стадии заболевания. С учетом этого с глобальной точки зрения в мире продолжается пандемия ВИЧ-инфекции. С наступлением 2020 года и официальным объявлением пандемии COVID-19 для специалистов, занимающихся проблемами ВИЧ-инфекции, вопрос взаимодействия этих двух заболеваний стал очень актуальным, и в ряде источников литературы нередко можно встретить термин «синдемия».

Определенную проблему представляет дифференциальная диагностика поражений легких при COVID-19 и оппортунистических инфекциях при выраженном иммунодефиците. В круг дифференциальных диагнозов у ВИЧ-инфицированных пациентов следует включать в первую очередь пневмоцистную и цитомегаловирусную пневмонию, отдельные формы туберкулеза легких [2]. Сложность заключается в том, что отчетливых клинических, лабораторных и инструментальных признаков, на которые можно однозначно полагаться, не существует.

Относительно морфологической диагностики структурных изменений легочной ткани обнаружение РНК SARS-CoV-2 с помощью секвенирования на ранней стадии заболевания (до 10 дней) позволяет предположить, что вирус играет главную роль в инициировании острого повреждения легких. Цитопатические изменения в эпителии обусловлены, вероятнее всего, прямым вирусным повреждением бронхиолярного эпителия, альвеолоцитов I и II типа, преимущественно экспрессирующих рецепторы к ангиотензинпревраща-

ющему ферменту (ACE-2) – основному рецептору вирусного проникновения в клетку [3]. Для экссудативной фазы диффузного альвеолярного повреждения описаны следующие признаки: внутриальвеолярный отек, гиалиновые мембраны по контурам альвеол, реже респираторных бронхиол, пролиферация альвеолоцитов II типа, десквамация альвеолярного эпителия в просвет альвеол в виде пластов, наличие уродливых и многоядерных клеток, наличие в просветах альвеол макрофагов, лимфоцитов, единичных нейтрофилов, микротромбы в капиллярах межальвеолярных перегородок, мелких ветвях легочных артерий и вен [4, 5].

В доступной литературе относительно мало публикаций, посвященных гистологическому исследованию изменений ткани легких при сочетании оппортунистических ВИЧ-ассоциированных поражений с COVID-пневмонией. Приводим собственное наблюдение.

## Клиническое наблюдение

Пациент С. 1960 года рождения был доставлен в декабре 2020 года в реанимационное отделение ИКБ № 2 города Москвы в крайне тяжелом состоянии вследствие декомпенсированной дыхательной недостаточности. Пациент находился на неинвазивной респираторной поддержке с инсуффляцией кислорода масочным способом. Из анамнеза известно, что заболевание манифестировало за месяц до госпитализации с лихорадочно-интоксикационной и респираторной симптоматики (кашель, одышка). На пятый день от начала заболевания выполнена КТ органов грудной клетки, по данным которой наблюдались изменения, типичные для COVID-ассоциированной пневмонии, объем поражения – КТ-3 (тяжелая степень). В течение месяца пациент находился на стационарном лечении в инфекционном госпитале в Московской области с диагнозом «новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2, вирус не идентифицирован, среднетяжелая форма течения, двусторонняя полисегментарная пневмония». По неизвестным причинам был выписан из лечебного учреждения и доставлен в ИКБ № 2 с декомпенсированной респираторной недостаточностью в сопровождении бригады скорой медицинской помощи. Кроме того, в сопроводительной документации указывалось наличие у пациента ВИЧ-инфекции ста-



дии 4 Б-В, фазы прогрессирования без антиретровирусной терапии (АРТ). Относительно давности инфицирования ВИЧ достоверных данных не было, на учете в Московском городском центре профилактики и борьбы со СПИДом (МГЦ СПИД) пациент не состоял, иммунный блот датирован серединой декабря 2020 года, то есть вполне возможно предположить, что ВИЧ-инфекция была впервые выявленной.

При поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии ИКБ № 2 имела место декомпенсированная респираторная недостаточность. Уровень нарушения сознания – 12 баллов по шкале Глазго (сопор). При осмотре обращали на себя внимание истощение пациента, цианотичность кожного покрова, следы от инъекций в проекции кубитальных вен. Физикальное обследование выявило тахикардию до 110 ударов в минуту, тенденцию к гипотензии, 98/64 мм рт. ст., аускультативно в легких выслушивались жесткое дыхание, ослабленное в дорсальных отделах с двух сторон, мелкопузырчатые влажные хрипы, сатурация кислорода ( $SpO_2$ ) – 86%. В отделении была продолжена оксигенотерапия в режиме High flow – 60 л/мин,  $FiO_2$  – 88%. При рентгенографии в легких обнаружены обширные инфильтраты средней интенсивности, без четких контуров, усиление и деформация легочного рисунка, расцененные как двусторонняя полисегментарная пневмония. Лабораторно в общем анализе крови – палочкоядерный сдвиг лейкоцитарной формулы при нормальном уровне лейкоцитов, выраженная лимфопения (4%,  $0,2 \times 10^9$ /л). В остальных анализах регистрировалось повышение уровня прокальцитонина более чем в 25 раз от верхней границы нормы, повышение острофазовых показателей: ферритин повышен до 2N, СРБ – до 49N. Также отмечены повышение АСТ до 1,5N, ЛДГ – до 4,5N, общей КФК – до 2N, мочевины – до 1,5N, гипопроотеинемия и гипоальбуминемия, D-димер в 3 раза выше верхней границы референсного интервала. По УЗИ органов брюшной полости, почек, плевральных полостей – без значимых особенностей. ПЦР на РНК SARS-CoV-2 из носо/ротоглотки – положительно, вирус идентифицирован. К сожалению, ввиду краткости пребывания в стационаре исследование иммунного статуса и вирусной нагрузки (ВИЧ) выполнено не было.

На вторые сутки пребывания пациента в реанимации в связи со стойкой дыхательной недостаточностью, десатурацией принято решение о замещении функции внешнего дыхания, выполнены оротрахеальная интубация трахеи и перевод на искусственную вентиляцию легких с параметрами  $DO = 400$  мл, ЧД = 28, ПДКВ = 11 мбар, Рпик = 29 мбар,  $FiO_2 = 90\%$ , МОД = 10 л/мин. Была продолжена и комплексная интенсивная терапия, однако состояние пациента продолжало ухудшаться. В этот же день в реанимации при явлениях прогрессирования полиорганной недостаточности развилась асистолия. Реанимационные мероприятия в полном объеме в течение 30 минут

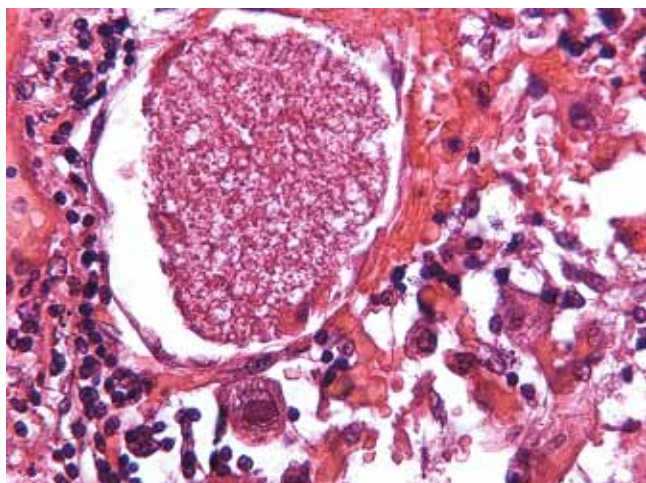
эффекта не достигли, констатирована биологическая смерть.

При аутопсии обращали на себя внимание следующие особенности. Труп мужчины пониженного питания. Легкие полностью выполняли плевральные полости, в просвете трахеи и бронхов всех калибров сероватая слизь, слизистая оболочка трахеи и бронхов всех калибров сероватая, влажная. Легкие массой 1890 г, тотально уплотнены, с поверхности темно-красные, лакового вида, на разрезе серовато-красноватого цвета, с поверхности разрезов стекает небольшое количество полупрозрачной густой жидкости. Почки массой 300 г, капсула с почек снимается легко, обнажая гладкую красно-коричневую поверхность, на разрезе граница коры и пирамид четкая, пирамиды темно-красные, ширина коркового слоя 1,2 см, слизистая оболочка лоханок и мочеточников бледно-серая, влажная, блестящая. Селезенка массой 160 г, эластичная, с гладкой поверхностью, на разрезе вишневого цвета, без соскоба пульпы.

Для проведения ПЦР тестов и посева на аутопсии были взяты образцы тканей трахеи, легких, сердца, селезенки. РНК SARS-CoV-2 по результатам тестирования обнаружена во всех перечисленных образцах, кроме селезенки. В легких при исследовании ПЦР-комплекса обнаружены ДНК *Human herpesvirus 6*-го типа (222 копии/мл); ДНК *Cytomegalovirus* ( $1,34 \times 10^6$  копии/мл); ДНК *Pneumocystis jirovecii* и *Candida albicans*. В результате бактериологического посева (легкие) выявлен рост *Enterococcus faecalis*.

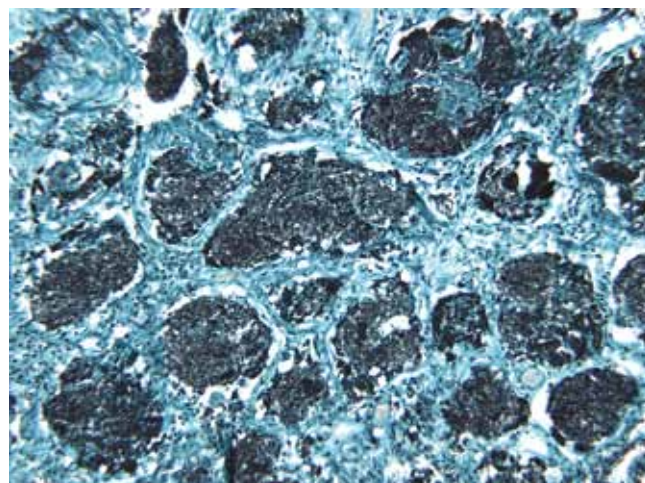
При гистологическом исследовании в легких часть межальвеолярных перегородок была инфильтрирована умеренным количеством лимфоцитов, в просветах альвеол – десквамированные альвеолоциты II типа в виде пластов, гиалиновые мембраны по контуру альвеол, в просветах значительной части альвеол пенистый экссудат с наличием пузырьковидных телец (положительная окраска при ШИК-реакции), в межальвеолярных перегородках множественные клетки с цитомегаловирусной трансформацией («совиный глаз») (рис. 1). При окрашивании по Грококту в описанном выше экссудате выявлены клетки пневмоцисты (рис. 2). При иммуногистохимическом исследовании с моноклональными мышинными антителами (NCL-CMV-IE/EA, Novocastra, Великобритания) выявлены клетки, пораженные цитомегаловирусом (рис. 3). При иммуногистохимическом исследовании с мышинными моноклональными антителами против нуклеокапсида SARS-CoV-2 (clone x155, ООО «ХЕМА», Россия) коронавирус был выявлен в гиалиновых мембранах и единичных альвеолоцитах (рис. 4).

В трахее при сохранности эпителия на большем протяжении обнаружена диффузная лимфоплазматическая инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. В головном мозге были обнаружены отек мягкой мозговой оболочки с очаговым фиброзом и резким полнокровием сосудов, участки диапедезных



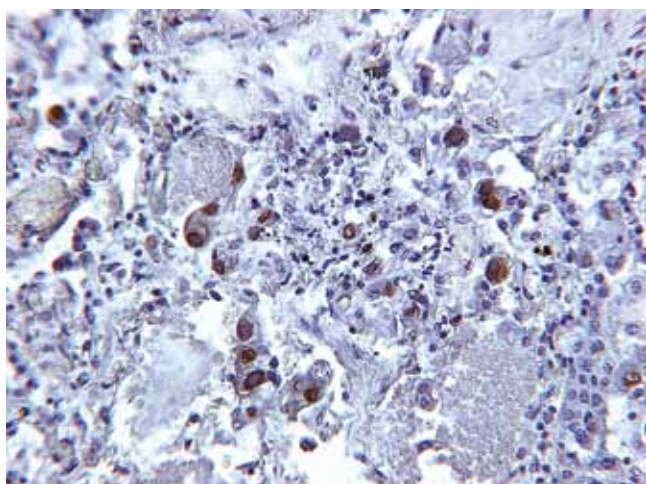
*Рис. 1.* Внутриальвеолярное скопление пенистых масс (клетки пневмоцист), альвеолоцит с цитомегаловирусной трансформацией ядра. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

*Fig. 1.* Intraalveolar accumulation of foamy masses (pneumocyst cells), alveolocyte with cytomegalovirus transformation of the nucleus. H&E stain,  $\times 400$



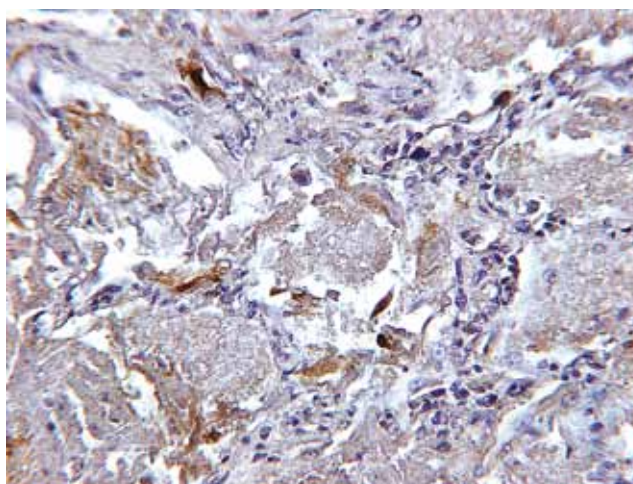
*Рис. 2.* Внутриальвеолярное скопление пенистых масс (клетки пневмоцист). Окраска по Грокотту,  $\times 100$

*Fig. 2.* Intraalveolar accumulation of foamy masses (pneumocyst cells). Grocott stain,  $\times 100$



*Рис. 3.* Альвеолоциты с цитомегаловирусной трансформацией. Иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 200$

*Fig. 3.* Alveolocytes with cytomegalovirus transformation. IHC assay,  $\times 200$



*Рис. 4.* Положительное окрашивание SARS-CoV-2 в альвеолоцитах и гиалиновых мембранах. Иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 100$

*Fig. 4.* Positive staining of SARS-CoV-2 in alveolocytes and hyaline membranes. IHC assay,  $\times 100$

кровоизлияний, стаз эритроцитов в капиллярах. В миокарде – гипертрофия части кардиомиоцитов с перинуклеарным отложением зерен липофусцина, очаговая вакуольная дистрофия кардиомиоцитов, стаз эритроцитов в капиллярах и очаговые кровоизлияния. В надпочечниках диффузная мононуклеарная инфильтрация с наличием клеток цитомегаловирусной трансформации. В селезенке участки кровоизлияний, полнокровие красной пульпы, десквамация эндотелиоцитов артериол. В печени жировая дистрофия части гепатоцитов и мелкоочаговые кровоизлияния.

Таким образом, на основании лабораторных данных, а также результатов макро- и микроскопического

исследования новая коронавирусная инфекция у ВИЧ-инфицированного пациента С. протекала как интерстициальная пневмония в виде экссудативной фазы диффузного альвеолярного повреждения с мультиорганным поражением (трахея, сердце). Также обнаружено двустороннее тотальное поражение легких, которое обусловлено развитием оппортунистических инфекций в рамках ВИЧ-инфекции стадии 4В как конкурирующего заболевания. *Cytomegalovirus*, *Pneumocystis jirovecii* и *Candida albicans*, обнаруженные в описанном клиническом случае, являются, пожалуй, самыми распространенными среди возможных оппортунистов. Роль вируса простого герпеса 6-го типа неоднознач-

на и дискуссионна, в литературе имеются указания на отдельные клинические случаи изолированного поражения легких этим патогеном у пациентов с иммунодефицитами после трансплантации органов [6], а также единичные у иммунокомпетентных [7]. В нашем наблюдении можно предположить, что роль вируса простого герпеса 6-го типа не была клинически значимой из-за низкой вирусной нагрузки по данным посмертного ПЦР-исследования в сравнении с аналогичным результатом по другому представителю семейства вирусов герпеса – цитомегаловирусу. Методом бактериологического посева посмертно был выделен *Enterococcus faecalis*, являющийся условным патогеном, обычно населяющим желудочно-кишечный тракт. В случае иммунодефицитных состояний энтерококк может быть самостоятельным этиологическим агентом, поражать многие системы органов и выступать в роли нозокомиального патогена [8].

В контексте взаимовлияния этих нозологий хотелось бы выделить две масштабные проблемы. Первая касается вопроса тяжести течения и рисков неблагоприятных исходов COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов. Вторая проблема фокусируется на сложностях дифференциальной диагностики интерстициальных поражений легочной ткани при оппортунистических заболеваниях в рамках ВИЧ-инфекции у пациентов с выраженным иммунодефицитом и COVID-ассоциированной пневмонии.

На сегодняшний момент, несмотря на практически двухлетний период пандемии COVID-19, нет однозначного ответа на вопрос, является ли ВИЧ-инфекция фактором риска тяжелого течения новой коронавирусной инфекции. Результаты доступных систематических обзоров и метаанализов противоречивы [9–13], большинство касается пациентов с контролируемым заболеванием, получающих эффективную АРТ. С одной стороны, исследователи считают, что ВИЧ-инфицированные пациенты с сохраненным иммунным статусом демонстрируют сопоставимую клиническую картину, частоту осложнений и летальных исходов с ВИЧ-негативной популяцией пациентов [9, 10, 13]. Высказывались предположения о том, что пациенты с выраженным иммунодефицитом в определенной мере могут быть защищены от тяжелого течения COVID-19, поскольку цитокиновый шторм и развитие респираторного дистресс-синдрома обусловлены гиперактивацией иммунной системы [14]. Но, с другой стороны, в ряде исследований продемонстрированы более частые случаи госпитализации при коинфекции, вызванной ВИЧ и SARS-CoV-2, а также увеличение относительных рисков летальных исходов [11, 12]. Тем не менее важно отметить, что в статьях, указывающих на ВИЧ-инфекцию как фактор риска тяжелого течения, авторы предполагают возможное влияние системной иммуноактивации и более раннего развития у ВИЧ-позитивной когорты, в том числе при эффективной АРТ, состояний, являющихся признанными факторами

риска тяжелого течения COVID-19, таких как атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, хронические болезни печени и почек [10]. Также группа ВИЧ-инфицированных пациентов в указанных работах оценивалась в целом, без учета уровней иммунодефицита, показателей CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и наличия диагностированных оппортунистических заболеваний, что делает когорту весьма неоднородной [11, 12].

## Заключение

В приведенном наблюдении описано поражение легких при новой коронавирусной инфекции у ВИЧ-инфицированного пациента. При помощи дополнительных методик удалось установить, что основными этиологическими агентами пневмонии являлись SARS-CoV-2 в сочетании с *Cytomegalovirus*, *Pneumocystis jirovecii* и *Candida albicans*.

Проблема COVID-19 весьма актуальна и не обходит стороной столь неоднородную и вариабельную по многим признакам популяцию, как ВИЧ-инфицированные пациенты, поэтому данный случай наглядно демонстрирует необходимость и важность применения дополнительных методов исследования – гистохимического, иммуногистохимического окрашивания и исследований аутопсийного материала методом ПЦР.

## Литература/References

- UNAIDS data 2021. World AIDS day report 2021. Available from: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2021\\_WAD\\_report\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2021_WAD_report_en.pdf) (accessed 16.05.2022)
- Kerkhoff AD, Havlir DV. CROI 2021: Tuberculosis, opportunistic infections, and COVID-19 among people with HIV. *Top Antivir Med.* 2021;29(2):344–51. PMID: 34107204.
- Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: A two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(10):1135–40. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
- Самсонова М.В., Черняев А.Л., Омарова Ж.Р., Першина Е.А., Мишнев О.Д., Зайратьянц О.В. и др. Особенности патологической анатомии легких при COVID-19. *Пульмонология.* 2020;30(5):519–532. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532.  
*Samsonova MV, Chernyaev AL, Omarova ZhR, Pershina EA, Mishnev OD, Zayratyants OV et al.* Features of pathological anatomy of lungs at COVID-19. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology.* 2020;30(5):519–532 (In Russ.). DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532.
- Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Крупнов Н.М. и др. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас / Под общ. ред. О.В. Зайратьянца. Москва: Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы, 2020. 140 с. Доступно по адресу: <https://niioz.ru/upload/medialibr>

- ary/2c5/2c5e36822be6633e1cbd2e72058720ae.pdf (получено 16.05.2022)
- Zairatyants OV, Samsonova MV, Mikhaleva LM, Chernyaev AL, Mishnev OD, Krupnov NM et al. Pathological anatomy of COVID-19: Atlas / Under the general editorship of O.V. Zairatyants. Moscow: Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, 2020. 140 p. Available from: <https://niioz.ru/upload/medialibrary/2c5/2c5e36822be6633e1cbd2e72058720ae.pdf> (accessed 09.03.2022)
- De Rose DU, Auriti C, Lozzi S, Coltella L, Piccioni L, Rossi S et al. Severe herpes virus 6 interstitial pneumonia in an infant with three variants in genes predisposing to lung disease. *J Med Virol.* 2021;93(8):5182–7. DOI: 10.1002/jmv.27016.
  - Alkozah M, Hallak R, Bou Akl I, El Zakhem A. Human herpes virus-6 (HHV-6) pneumonitis and meningitis with viraemia in an immunocompetent adult patient. *BMJ Case Rep.* 2021;14(3):e239220. DOI: 10.1136/bcr-2020-239220.
  - Brown AO, Singh KV, Cruz MR, Kaval KG, Francisco LE, Murray BE et al. Cardiac microlesions form during severe bacteremic *Enterococcus faecalis* infection. *J Infect Dis.* 2021;223(3):508–16. DOI: 10.1093/infdis/jiaa371.
  - Lee KW, Yap SF, Ngeow YF, Lye MS. COVID-19 in people living with HIV: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(7):3554. DOI: 10.3390/ijerph18073554.
  - Vizcarra P, Pérez-Eliás MJ, Quereda C, Moreno A, Vivancos MJ, Dronza F et al. Description of COVID-19 in HIV-infected individuals: A single-centre, prospective cohort. *Lancet HIV.* 2020;7(8):e554–e564. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30164–8.
  - Danwang C, Noubiap JJ, Robert A, Yombi JC. Outcomes of patients with HIV and COVID-19 co-infection: A systematic review and meta-analysis. *AIDS Res Ther.* 2022;19(1):3. DOI: 10.1186/s12981-021-00427-y.
  - Ssentongo P, Heilbrunn ES, Ssentongo AE, Advani S, Chinchilli VM, Nunez JJ et al. Epidemiology and outcomes of COVID-19 in HIV-infected individuals: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2021;11(1):6283. DOI: 10.1038/s41598-021-85359-3.
  - Liang M, Luo N, Chen M, Chen C, Singh S, Singh S et al. Prevalence and mortality due to COVID-19 in HIV co-infected population: A systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Ther.* 2021;10(3):1267–85. DOI: 10.1007/s40121-021-00447-1.
  - Lesko CR, Bengtson AM. HIV and COVID-19: Intersecting epidemics with many unknowns. *Am J Epidemiol.* 2021;190(1):10–6. DOI: 10.1093/aje/kwaa158.

### Информация об авторах

Юрий Георгиевич Пархоменко – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», заведующий патологоанатомическим отделением инфекционной клинической больницы № 2.

Андрей Львович Черняев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом фундаментальной пульмонологии НИИ пульмонологии ФМБА России, профессор кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Павел Александрович Ведяпин – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Наталья Владимировна Мозгалева – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

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

Олег Александрович Тишкевич – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Екатерина Андреевна Гомзикова – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Мария Викторовна Самсонова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии НИИ пульмонологии ФМБА России, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии МКНЦ им. А.С. Логинова.

Александра Сергеевна Жиленкова – врач-инфекционист научно-клинического отдела Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом.

Юрий Степанович Лебедин – кандидат медицинских наук, директор ООО «Хема».

### Author information

Yury G. Parkhomenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Head of the Pathology Department of Infectious Clinical Hospital No. 2.  
<https://orcid.org/0000-0001-9857-3402>

Andrey L. Chernyaev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Fundamental Pulmonology Department, Research Institute of Pulmonology; Professor, Department of Pathology and Clinical Pathology, Pirogov Russian National Research Medical University; Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.  
<https://orcid.org/0000-0003-0973-9250>

Pavel A. Vedyapin – Pathologist, Pathology Department, Infectious Clinical Hospital No. 2.  
<https://orcid.org/0000-0002-4194-0272>

Natalia V. Mozgaleva – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Pathology Department, Infectious Clinical Hospital No. 2.  
<https://orcid.org/0000-0002-4416-6884>

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

Oleg A. Tishkevich – Pathologist, Pathology Department, Infectious Clinical Hospital No. 2.  
<https://orcid.org/0000-0002-0789-7709>

Ekateryna A. Gomzikova – Pathologist, Pathology Department, Infectious Clinical Hospital No. 2.  
<https://orcid.org/0000-0002-3884-4781>

Maria V. Samsonova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Laboratory, Research Institute of Pulmonology; Senior Researcher, Pathomorphology Department, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center.  
<http://orcid.org/0000-0001-8170-1260>

Aleksandra S. Zhilenkova – Infectionist, Scientific and Clinical Department, Moscow City Center for the Prevention and Control of AIDS.  
<https://orcid.org/0000-0001-8139-4061>

Yury S. Lebedin – Cand. Sci. (Med.), Director, XEMA Company Limited.  
<http://orcid.org/0000-0003-4250-4322>



# КОНСУЛЬТАТИВНО- ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР



## НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ РАБОТЫ

## КОНСУЛЬТАТИВНЫЕ УСЛУГИ НАУЧНЫМ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ОРГАНИЗАЦИЯМ

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Патоморфологические исследования биопсийного и операционного материала
- Патоморфологическое исследование материала ветеринарных клиник и экспериментального материала
- Иммуногистохимические исследования
- Иммуноферментный анализ гормонов тиреоидной и репродуктивной панели, онкомаркеров, цитокинов, факторов роста, иммуноглобулинов
- Биохимические исследования ферментов и метаболитов
- Проточная цитофлуориметрия субпопуляций лимфоцитов и маркеров активации
- Фотодокументирование результатов исследования
- Оценка эффективности лекарственных средств на экспериментальных моделях заболеваний человека

## НАШИ ПРИОРИТЕТЫ:

- ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО морфологических ИССЛЕДОВАНИЙ
- ПРОФЕССИОНАЛИЗМ сотрудников и СООТВЕТСТВИЕ оборудования и методов научных исследований МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТАМ

## Контакты:

Адрес: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Телефон: (499)120-94-79

Телефон/факс: (499)120-80-65

E-mail: morfolhum@mail.ru

**[www.morfolhum.ru](http://www.morfolhum.ru)**

Лицензия Федеральной службы надзора  
в сфере здравоохранения и социального развития  
№ ФС-99-01-007950 от 10 апреля 2012

