

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 13 | № 1 | 2024

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

«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, 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 № ФС77-83521
от 24 июня 2022 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,
Москва, Россия

Почетный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

Процина А.Е., доктор биол. наук, доцент, Москва, Россия

Редакционная коллегия

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

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

Арешидзе Д.А. кандидат биол. наук,
Москва, Россия

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

Баринова И.В., доктор мед. наук,
Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

Авагимян А.А., кандидат мед. наук,
Ереван, Армения

Бухвалов И.Б., доктор биол. наук,
профессор, Гамбург, Германия

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

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

Гарновская М.Н., кандидат биол. 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

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

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

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

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

Фатхудинов Т.Х., доктор мед. наук,
доцент, 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

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume **13** | No **1** | 2024

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

“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:

7045 according
to the “Ural-Press” agency catalog

7045 according to the “Pressa
Rosii” catalog via ARZI agency

The mass media registration
certificate III № ФС77-83521
dated June 24, 2022

© 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, Moscow, Russia

Honorary Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Executive Secretaries

Proshchina Alexandra E., Dr. Sci. Biol., Associate Professor, Moscow, Russia

Editorial Board

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

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

Areshidze, David A., Cand. Sci. Biol.,
Moscow, Russia

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

Barinova, Irina V., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Advisory Board

Avagimyan, Ashot A., Cand. Sci. Med.,
Yerevan, Armenia

Buchwalow, Igor B., Dr. Sci. Biol., Professor,
Hamburg, Germany

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

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

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

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

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

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

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

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH**

- | | | |
|--|----|--|
| <p><i>Н.В. Мозгалева, Ю.Г. Пархоменко,
А.Л. Черняев, М.В. Самсонова, П.А. Ведяпин,
Н.В. Глухоедова, А.С. Жиленкова,
Е.В. Цыганова, О.А. Тишкевич, А.И. Мазус</i>
Особенности поражения легких
при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 у пациентов
с разной степенью иммунодефицита</p> | 5 | <p><i>N.V. Mozgaleva, Yu.G. Parkhomenko,
A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, P.A. Vedyapin,
N.V. Glukhoedova, A.S. Zhilenkova,
E.V. Tsyganova, O.A. Tishkevich, A.I. Mazus</i>
Features of lung lesions in HIV/SARS-CoV-2
coinfection in patients with varying degrees
of immunodeficiency</p> |
| <p><i>А.С. Конторщикова, М.А. Кунизева,
Е.П. Батракова, З.Б. Джафарова, О.А. Васюкова,
С.А. Карпушов, В.В. Варясин, Э.Э. Бережная,
Л.В. Кактурский, Л.М. Михалева</i>
Клинико-морфологические особенности
патологии миокарда и тромботической
микроангиопатии у пациентов с COVID-19</p> | 14 | <p><i>A.S. Kontorshchikov, M.A. Kunizheva,
E.P. Batrakova, Z.B. Dzhafarova, O.A. Vasyukova,
S.A. Karpushov, V.V. Varyasin, E.E. Berezhnaya,
L.V. Kakturskiy, L.M. Mikhaleva</i>
Clinical and morphological features of myocarditis
pathology and thrombotic microangiopathy
in COVID-19 patients</p> |
| <p><i>А.В. Лагурева, Н.Г. Плехова, А.А. Цибулина,
Ю.И. Гаман, А.А. Семенова, В.И. Апанасевич</i>
Роль вируса папилломы человека в развитии
эпителиальных опухолей молочной железы</p> | 24 | <p><i>A.V. Lagureva, N.G. Plekhova, A.A. Tsibulina,
Yu.I. Gaman, A.A. Semenova, V.I. Apanasevich</i>
The role of human papillomavirus in the epithelial
breast tumor formation</p> |
| <p><i>Р.В. Тахавиев, Г.В. Брюхин, Е.С. Головнева</i>
Динамика гиперхромных и MyoD-позитивных
ядер регенерирующих скелетных мышц при
инфракрасной фотомодуляции</p> | 34 | <p><i>R.V. Takhaviev, G.V. Bryukhin, E.S. Golovneva</i>
Dynamics of hyperchromic and MyoD-positive nuclei
of regenerating skeletal muscles during infrared
photomodulation</p> |
| <p><i>А.Д. Коняева, Н.Н. Байтингер, Е.Ю. Варакута,
Л.Р. Мустафина, С.В. Логвинов, А.В. Герасимов,
А.В. Потапов, М.Б. Плотников</i>
Влияние п-тирозол на морфофункциональные
изменения сосудов слизистой оболочки губы
в условиях экспериментального стоматита</p> | 42 | <p><i>A.D. Koniaeva, N.N. Baitinger, E.Yu. Varakuta,
L.R. Mustafina, S.V. Logvinov, A.V. Gerasimov,
A.V. Potapov, M.B. Plotnikov</i>
Exploring the effect of p-tyrosol on vascular
morphofunctional changes in lip mucous membrane
during experimental stomatitis</p> |

*Е.А. Григорьева, В.С. Гордова,
В.Е. Сергеева, А.Т. Смородченко*
Реакция Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени
лабораторных крыс на двухмесячное поступление
водорастворимого кремния

50 *E.A. Grigoreva, V.S. Gordova,
V.E. Sergeeva, A.T. Smorodchenko*
Effect of a two-month water-soluble silicon intake
on Iba1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory
rats

*Н.И. Волоцкая, Т.П. Макалиш, Г.И. Подгорный,
М.А. Кальфа, Н.С. Прасолов, А.В. Кубышкин,
Е.П. Коваленко, Е.Ю. Зяблицкая*
Гиперплазия эндометрия: патогенетические
лечебные подходы (экспериментальное
исследование)

59 *N.I. Volotskaya, T.P. Makalish, G.I. Podgorny,
M.A. Kalfa, N.S. Prasolov, A.V. Kubyshkin,
E.P. Kovalenko, E.Y. Zyablitskaya*
Endometrial hyperplasia: pathogenetic therapeutic
approaches (experimental study)

МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

Т.А. Гаркуша
Оптимизация протокола макроскопического
исследования почки после нефрэктомии
при новообразовании

69 *T.A. Garkusha*
Optimization of the protocol for kidney gross
examination after nephrectomy due to neoplasm

*М.И. Пахарукова, Е.Е. Лысак, К.В. Рыжанкова,
М.А. Котугина, Л.Н. Ребрикова, П.Е. Ермолаева,
Я.Б. Бейкин*
Практический опыт применения
цито-гистологической корреляции как способ
обеспечения контроля качества исследований
при диагностике патологии шейки матки

76 *M.I. Pakharukova, E.E. Lysak, K.V. Ryzhankova,
M.A. Kotugina, L.N. Rebrikova, P.E. Ermolaeva,
Ya.B. Beikin*
Application of cyto-histological correlation as a quality
control in diagnosing cervical pathology

Особенности поражения легких при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 у пациентов с разной степенью иммунодефицита

Н.В. Мозгалева¹, Ю.Г. Пархоменко^{1,5}, А.Л. Черняев^{2,3,5}, М.В. Самсонова^{3,4}, П.А. Ведяпин¹,
Н.В. Глухоедова⁶, А.С. Жиленкова⁶, Е.В. Цыганова⁶, О.А. Тишкевич¹, А.И. Мазус⁶

¹ ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

⁶ Московский городской центр профилактики и борьбы со СПИДом Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Введение. Развитие глобального пандемического процесса COVID-19 в условиях продолжающейся пандемии ВИЧ-инфекции поставило перед исследователями вопрос особенностей коинфекции SARS-CoV-2 и ВИЧ. В настоящем исследовании представлены морфологические изменения легочной ткани при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 у пациентов с разной степенью сохранности иммунного статуса. **Материалы и методы.** В исследование включены шесть умерших ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническим диагнозом «COVID-19», подтвержденным посмертно выявлением РНК SARS-CoV-2 в аутопсийных образцах легких методом полимеразной цепной реакции. Среди умерших три пациента с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией и три пациента с контролируемой ВИЧ-инфекцией, получавших эффективную антиретровирусную терапию, и относительно сохранным иммунным статусом (CD4+ более 200 кл/мкл), без оппортунистических инфекционных заболеваний. При гистологическом исследовании было использовано гистохимическое окрашивание по ван Гизону, Грокотту, Циллю–Нильсену. ШИК-реакцию, иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили с использованием антител против нуклеокапсида SARS-CoV-2 и цитомегаловируса.

Результаты. Макроскопическая картина во всех случаях характеризовалась снижением воздушности и уплотнением легочной ткани. Микроскопически поражение легких у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией было представлено картиной диффузного альвеолярного повреждения (ДАП) в сочетании с пневмоцистной пневмонией и цитомегаловирусной инфекцией. При ИГХ исследовании в легочной ткани этих умерших выявлена экспрессия нуклеокапсида SARS-CoV-2 в гиалиновых мембранах и альвеолоцитах. У пациентов с контролируемой ВИЧ-инфекцией зафиксированы проявления различных фаз ДАП и/или синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром) с преимущественным распределением SARS-CoV-2 при ИГХ исследовании в макрофагах и внутри сосудов.

Заключение. Поражение легких при глубоком ВИЧ-ассоциированном иммунодефиците определялось совокупностью прямого цитопатического действия коронавируса и патогенов-оппортунистов. При контролируемой ВИЧ-инфекции и относительно сохранном иммунном статусе сохраняются помимо прямого возможности иммуноопосредованного действия SARS-CoV-2 на легочную ткань с исходом в диффузное альвеолярное повреждение, что по морфологической картине сопоставимо с ВИЧ-негативными наблюдениями.

Ключевые слова: COVID-19, ВИЧ-инфекция, цитомегаловирус, пневмоциста, диффузное альвеолярное повреждение, сочетанное поражение легких

Для корреспонденции: Наталья Владимировна Мозгалева. E-mail: mozgalevanv@yandex.ru

Для цитирования: Мозгалева Н.В., Пархоменко Ю.Г., Черняев А.Л., Самсонова М.В., Ведяпин П.А., Глухоедова Н.В., Жиленкова А.С., Цыганова Е.В., Тишкевич О.А., Мазус А.И. Особенности поражения легких при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 у пациентов с разной степенью иммунодефицита. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):5–13. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.5-13.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 07.04.2023. Получена после рецензирования 05.06.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Features of lung lesions in HIV/SARS-CoV-2 coinfection in patients with varying degrees of immunodeficiency

N.V. Mozgaleva¹, Yu.G. Parkhomenko^{1,5}, A.L. Chernyaev^{2,3,5}, M.V. Samsonova^{3,4}, P.A. Vedyapin¹, N.V. Glukhoedova⁶, A.S. Zhilenkova⁶, E.V. Tsyganova⁶, O.A. Tishkevich¹, A.I. Mazus⁶

¹ Infectious Diseases Hospital No. 2, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Pulmonology Scientific Research Institute under Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ The Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia

⁵ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

⁶ Moscow Centre for HIV/AIDS Prevention and Treatment, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The development of the COVID-19 pandemic along with the ongoing pandemic of HIV infection has raised the question of how these two diseases interact. This study examines morphological changes that occur in lung tissue during HIV/SARS-CoV-2 coinfection in patients with varying levels of immune status.

Materials and methods. The study included 6 deceased HIV-infected patients who had a clinical diagnosis of COVID-19, which was confirmed postmortem by the detection of SARS-CoV-2 RNA in lung samples obtained during biopsy using polymerase chain reaction. Three patients were with newly diagnosed HIV infection; three patients had a relatively intact immune status (CD4+ more than 200 cells/μl) and no opportunistic infection and received effective antiretroviral therapy. To perform histologic examination, we used histochemical stains by Van Gieson, Grocott, Ziehl-Neelsen, PAS reaction as well as immunohistochemistry (IHC) with antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid and cytomegalovirus.

Results. The macroscopic picture in all cases was characterized by a decreased airiness and compaction of the lung tissue. Microscopically, patients with newly diagnosed HIV demonstrated diffuse alveolar damage (DAD) with pneumocystis pneumonia and cytomegalovirus infection. Nucleocapsid of SARS-CoV-2 was revealed in hyaline membranes and alveolar cells. In patients with controlled HIV, we detected manifestations of various phases of DAD and/or disseminated intravascular coagulation (DIC) syndrome with a predominant distribution of SARS-CoV-2 in macrophages and blood vessels.

Conclusion. Lung damage in severe HIV-associated immunodeficiency was determined by the combination of direct cytopathic effect of coronavirus and opportunistic pathogens. In controlled HIV and relatively intact immune status, immune mediated action of SARS-CoV-2 could take place manifesting in diffuse alveolar damage and making the morphological picture comparable to that in HIV-negative patients.

Keywords: COVID-19, HIV, cytomegalovirus, pneumocystis, diffuse alveolar damage, combined lung damage

Corresponding author: Natalia N. Mozgaleva. E-mail: mozgalevanv@yandex.ru

For citation: Mozgaleva N.V., Parkhomenko Yu.G., Chernyaev A.L., Samsonova M.V., Vedyapin P.A., Glukhoedova N.V., Zhilenkova A.S., Tsyganova E.V., Tishkevich O.A., Mazus A.I. Features of lung lesions in HIV/SARS-CoV-2 coinfection in patients with varying degrees of immunodeficiency. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.5-13.

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

Received 07.04.2023. **Received in revised form** 05.06.2023. **Accepted** 20.06.2023.

Введение

Новая коронавирусная инфекция – это первый глобальный пандемический процесс настоящего времени, который наслонился на фактически продолжающуюся с 1980-х годов пандемию ВИЧ-инфекции. Закономерно перед исследователями и медицинским сообществом возник вопрос особенностей коинфекции SARS-CoV-2 и ВИЧ, тяжести течения и рисков летальных исходов у коинфицированных пациентов.

Наш авторский коллектив в опубликованных ранее работах [1, 2] предпринял попытку проанализировать данные группы умерших пациентов с коинфекцией ВИЧ/SARS-CoV-2 с учетом иммунологического статуса. Отметим, что похожих публикаций, сопостави-

мых по объему и характеру выборки, среди доступных источников литературы нами не обнаружено. Общая группа ВИЧ-инфицированных пациентов в условиях реальной клинической практики отличается значительной неоднородностью. Также не всегда очевидны структура заключительного диагноза и степень вклада каждой нозологии в непосредственную причину летального исхода при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2. Нам удалось продемонстрировать ряд иммунологических особенностей таких пациентов. На фоне COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов происходит дальнейшее усугубление иммунодефицита вследствие снижения уровней CD4+ и CD8+ субпопуляций лимфоцитов. Пациенты с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, которые

составляли около 1/3 среди всех ВИЧ-инфицированных пациентов, подобного феномена не демонстрировали, вероятно, в связи с имеющимся к моменту заражения SARS-CoV-2 истощением иммунной системы [1]. На примере группы пациентов с контролируемой ВИЧ-инфекцией, то есть получающих эффективную антиретровирусную терапию (АРТ), удалось показать, что и сама COVID-19 непосредственно способна приводить к утяжелению иммунодефицита за счет достоверного снижения уровней CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Подобные наблюдения отмечались исследователями ранее, но для ВИЧ-негативных пациентов [3–8]. Цель данной работы – изучить морфологические изменения ткани легких при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 у пациентов с разной степенью сохранности иммунного статуса.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили легкие от шести пациентов с установленной ВИЧ-инфекцией, умерших в мае 2020 – феврале 2022 года. Во всех шести наблюдениях диагноз «COVID-19» подтвержден посмертно обнаружением РНК SARS-CoV-2 в аутопсийных образцах легких методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Двое мужчин и одна женщина – умершие пациенты с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией и трое (две женщины, один мужчина) – умершие пациен-

ты с контролируемой ВИЧ-инфекцией, получавшие эффективную АРТ, без диагностированных ранее оппортунистических заболеваний и с относительно сохранным иммунным статусом (CD4+ более 200 кл/мкл) на момент госпитализации в стационар. Выбор именно этих двух групп для анализа – впервые выявленная ВИЧ-инфекция и контролируемое заболевание – был обусловлен ранее описанными иммунологическими особенностями [1] и пониманием важности роли иммунной системы в процессе взаимодействия патогена и макроорганизма.

Краткая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Были проанализированы срезы легких, окрашенные гематоксилином и эозином по ван Гизону, Грокотту, Цилю–Нильсену, реактивом Шиффа. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием мышиных моноклональных антител против нуклеокапсида SARS-CoV-2 (клон X155, ООО «ХЕМА», Россия) и мышиных моноклональных антител против цитомегаловируса (NCL-CMV-IE/EA, Novocastra, Великобритания).

Результаты

Макроскопическая картина во всех наблюдениях характеризовалась снижением воздушности и уплотнением ткани легких, которые в наблюдениях с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией носили диффузный характер,

Таблица 1 | Table 1

Основные клинические характеристики пациентов | The main clinical features of the patients

№ No.	Пол пациента Patient's sex	Возраст, лет Age, years	Длительность COVID-19 по ПЦР, дней COVID-19 duration by PCR, days	CD4+ кл/мкл, % CD4+ cells/ μ l, %	Дополнительно Comments
Пациенты с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией Patients with newly diagnosed HIV					
1	Мужской Male	37	17	6,1	КТ: COVID-19, 70% поражения легких. D-димер 2,4N* CT: COVID-19, 70% lung involvement. D-dimer 2.4N*
2	Женский Female	62	11	Нет данных No data available	Двухсторонняя пневмония (рентгенография)**. D-димер 2N* Bilateral pneumonia (X-ray) **. D-dimer 2N*
3	Мужской Male	76	12	23,3	КТ: пневмоцистная пневмония. D-димер 3,4N* CT: pneumocystis pneumonia. D-dimer 3.4N*
Пациенты с контролируемой ВИЧ-инфекцией Patients with controlled HIV					
4	Женский Female	83	7	373, 25	КТ: отсутствие COVID-19. D-димер – норма*. Сахарный диабет. Артериальная гипертензия CT: no COVID-19. D-dimer within normal range*. Diabetes mellitus. Arterial hypertension
5	Мужской Male	49	10	301,35	КТ: COVID-19, 40–50% поражения легких. D-димер >54 000 нг/мл (220N)* CT: COVID-19, 40–50% lung involvement. D-dimer >54.000 ng/ml (220N)*
6	Женский Female	65	5	250,38	КТ: COVID-19, 60–70% поражения легких. Сахарный диабет, ожирение. D-димер >29 000 нг/мл (118N)* CT: COVID-19, 60–70% lung involvement. Diabetes mellitus, obesity. D-dimer >29.000 ng/ml (118N)*

КТ – компьютерная томография; * Референсные значения для D-димера (N): 0–250 нг/мл; ** – КТ не проводилась
CT – computed tomography; * Reference values for D-dimer (N): 0–250 ng/ml; ** – CT was not performed

вплоть до тотального, а в трех других наблюдениях были представлены очагами диаметром от 0,7 см до 2 см. В наблюдениях с контролируемой ВИЧ-инфекцией легкие на разрезе темно-серо-красные с относительно равномерным кровенаполнением, а в первой группе (наблюдения 1–3) ткань легких на разрезе розово-красного цвета с фиолетовым оттенком и неравномерным полнокровием.

При гистологическом исследовании легких умерших с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией наблюдали интерстициальную пневмонию в виде лимфоцитарной инфильтрации межальвеолярных перегородок разной степени выраженности и проявлениями ДАП. Для наблюдений 1 и 3 было характерно сочетание признаков экссудативной и пролиферативной фаз ДАП: наряду с обнаружением гиалиновых мембран по контурам альвеол и альвеолярных ходов, а также десквамацией альвеолярного и бронхиолярного эпителия были вы-

явлены очаговый фиброз межальвеолярных перегородок, полиповидные разрастания фибробластической (грануляционной) ткани в части альвеол, полиповидная фибробластическая ткань, очаговая плоскоклеточная метаплазия альвеолярного эпителия. В наблюдении 2 зафиксированы умеренно выраженная пролиферация и десквамация альвеолярного эпителия. При этом во всех трех наблюдениях данной группы (1–3) было выявлено сочетание пневмоцистной пневмонии (в просветах альвеол пенный экссудат с наличием пузырьковидных телец, положительно окрашиваемых при ШИК-реакции в ярко-малиновый цвет, с микробными клетками, окрашенными по Грокотту в черный цвет) и цитомегаловирусной инфекции (в виде множественных клеток с цитомегаловирусной трансформацией «совиный глаз», преимущественно в межальвеолярных перегородках) (рис. 1 А, В). При ИГХ исследовании

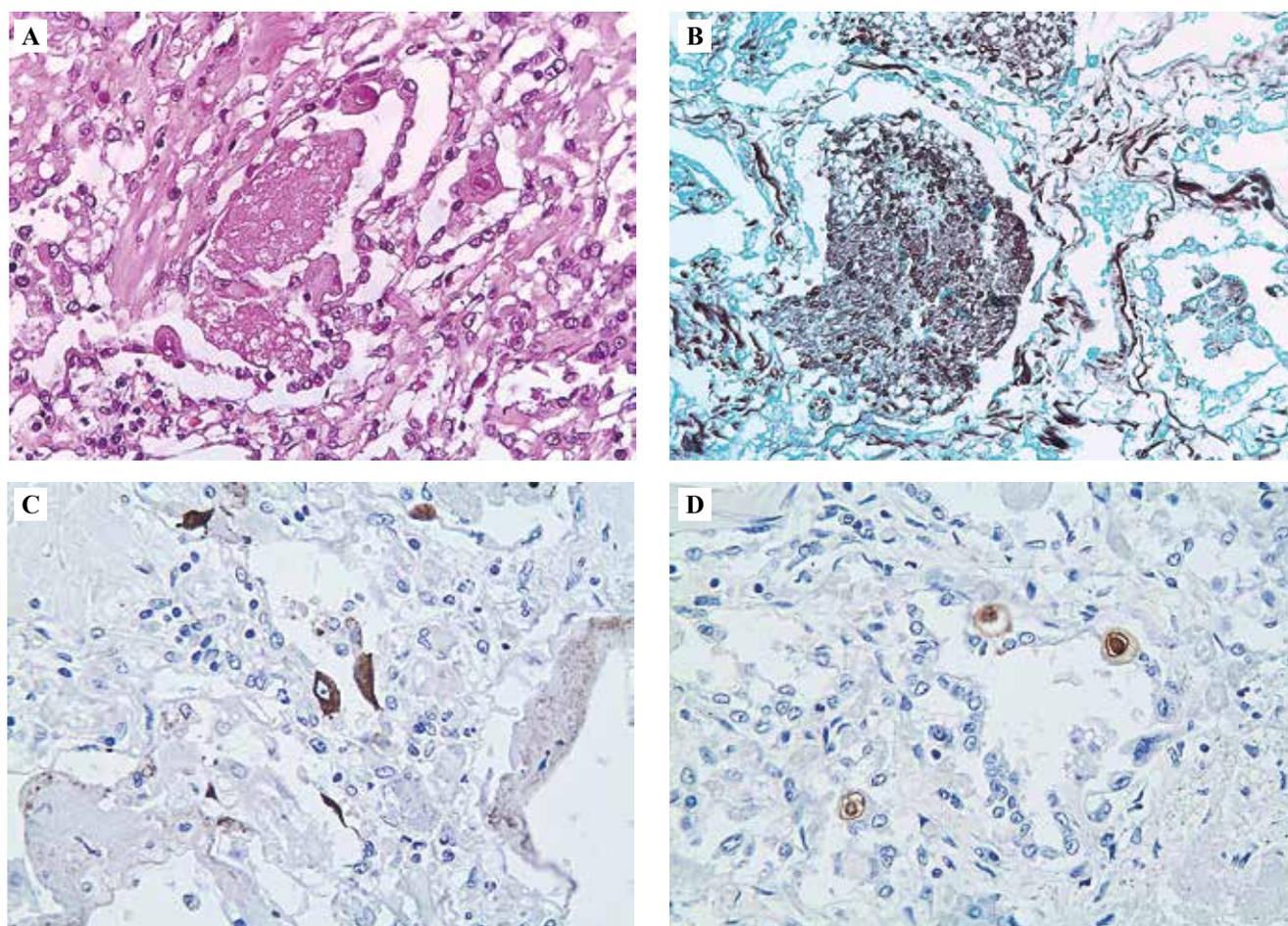


Рис. 1. Морфологические изменения в легких при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 при впервые выявленной ВИЧ-инфекции (наблюдение 1).

А – в просветах альвеол пенный экссудат, пролиферация и десквамация альвеолоцитов с цитомегаловирусной трансформацией. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. В – включения *Pneumocystis jirovecii* в альвеолярном экссудате. Окраска по Грокотту, $\times 400$. С – вирус SARS-CoV-2 в альвеолоцитах и гиалиновых мембранах. ИГХ, клон X155, $\times 400$. D – цитомегаловирус в измененных альвеолоцитах. ИГХ, NCL-CMV-IE/EA, $\times 400$

Fig. 1. Morphological changes in the lungs during HIV/SARS-CoV-2 coinfection with newly diagnosed HIV (case No. 1).

A – foamy exudate in the alveolar lumen, proliferation and desquamation of alveolar cells with cytomegalovirus transformation. H&E stain, $\times 400$. B – *Pneumocystis jirovecii* inclusions in alveolar exudate. Grocott stain, $\times 400$. C – SARS-CoV-2 virus in alveolar cells and hyaline membranes. IHC, clone X155, $\times 400$. D – cytomegalovirus in altered alveolar cells. IHC, NCL-CMV-IE/EA, $\times 400$

микропрепаратов легких этих пациентов получено яркое окрашивание с антителами против нуклеокапсида SARS-CoV-2 в гиалиновых мембранах и альвеолоцитах (рис. 1 С). Цитомегаловирусное поражение также подтверждалось положительным окрашиванием при ИГХ во всех трех наблюдениях (рис. 1 D).

Несколько иначе выглядели изменения ткани легких у пациентов с контролируемой ВИЧ-инфекцией. Гистологически в наблюдении 6 имела место экссудативная фаза ДАП с выраженным внутриальвеолярным отеком и наличием гиалиновых мембран. В наблюдении 5 было выявлено мозаичное поражение с чередованием участков интактной легочной ткани и картины экссудативной и пролиферативной фаз ДАП: интерстициальная лимфоцитарная инфильтрация с фиброзом части межальвеолярных перегородок, вирусная трансформация и десквамация альвеолоцитов 2-го типа, организующи-

еся массы фибрина в просветах альвеол в сочетании с внутриальвеолярным отеком и наличием гиалиновых мембран, полнокровием сосудов, явлениями стаза и обтурирующих фибриновых тромбов (рис. 2 А). В наблюдении 4 было обнаружено преобладание картины ДВС-синдрома (резкое полнокровие сосудов, кровоизлияния, микротромбы) без явных проявлений ДАП.

При иммуногистохимическом исследовании в наблюдениях 4 и 5 вирус SARS-CoV-2 был выявлен преимущественно в просвете сосудов, в тромбах, а также в макрофагах (наблюдение 4) и гиалиновых мембранах (наблюдение 5), при этом яркость окрашивания в целом была меньше в сравнении с наблюдениями первой группы (1 и 3) (рис. 2 В–D). В одном из образцов во второй группе (наблюдение 6) SARS-CoV-2 при ИГХ исследовании обнаружен не был, что, по всей вероятности, можно объяснить меньшей продолжительностью

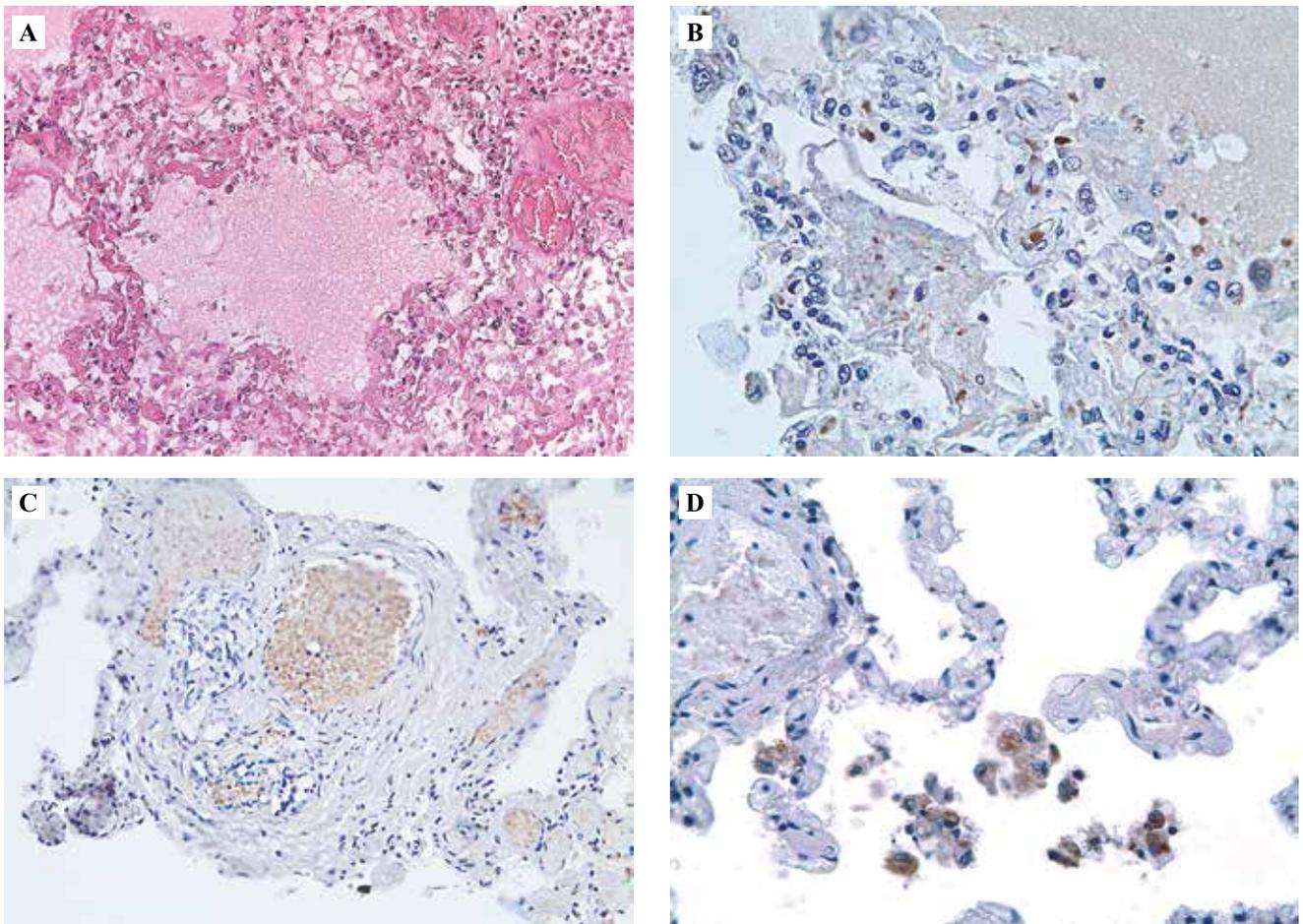


Рис. 2. Морфологические изменения в легких при коинфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 при контролируемой ВИЧ-инфекции. А – наблюдение 5. Стаз и полнокровие в сосудах, внутриальвеолярный отек с наличием гиалиновых мембран. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. В – наблюдение 5. Экспрессия SARS-CoV-2 в капиллярах и гиалиновых мембранах. ИГХ, клон X155, $\times 400$. С – наблюдение 4. Экспрессия SARS-CoV-2 в сосудах. ИГХ, клон X155, $\times 400$. D – наблюдение 4. Экспрессия SARS-CoV-2 в макрофагах. ИГХ, клон X155, $\times 400$

Fig. 2. Morphological changes in the lungs with HIV/SARS-CoV-2 coinfection with controlled HIV. А – case No. 5. Stasis and plethora in the vessels, pulmonary alveolar edema with the presence of hyaline membranes. H&E stain, $\times 400$. В – case No. 5. SARS-CoV-2 expression in the capillaries and hyaline membranes. IHC, clone X155, $\times 400$. С – case No. 4. SARS-CoV-2 expression in the vessels. IHC, clone X155, $\times 400$. D – case No. 4. SARS-CoV-2 expression in the macrophages. IHC, clone X155, $\times 400$

заболевания (5 дней), которая не привела к достаточному для окрашивания уровню вирусной репликации в отличие от ПЦР. Сводные результаты гистологического и иммуногистохимического исследований представлены в таблице 2.

Обсуждение

Принципиальным моментом при интерпретации полученных изменений в группах, по нашему мнению, является факт существующего тяжелого иммунодефицита и истощения иммунной системы к моменту заболевания COVID-19. В случае его наличия, как в группе с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, инфицирование SARS-CoV-2, по всей вероятности, выступает триггером прогрессирования оппортунистических заболеваний (в первую очередь пневмоцистной пневмонии и цитомегаловирусной инфекции с поражением легких) и утяжеления иммунодефицита. Этиология диффузного альвеолярного повреждения в этой ситуации смешанная, индивидуально могут превалировать патогены-оппортунисты, при этом уровень

репликации SARS-CoV-2 достаточно высок и поражение легких обусловлено в большей степени его прямым действием, а не опосредованным (цитокиновый шторм). Важно упомянуть, что доказана возможность длительной (месяцы) персистенции вируса с периодическим или постоянным выделением патогена на поверхность слизистой оболочки верхних дыхательных путей, особенно у пациентов с разными иммунодефицитами [9–12]. За счет каких конкретно механизмов реализуется такая длительная персистенция вируса, остается неясным. Одни исследователи предполагают возможность обратной транскрипции и последующей интеграции провируса в геном клеток с сохранением репликативного потенциала [13], другие не подтверждают данную теорию [14], однако важно подчеркнуть, что эти результаты получены на клеточных культурах, *in vitro*. В наблюдении 3 из нашей выборки, возможно, имела место длительная персистенция SARS-CoV-2, поскольку анамнестически за 4 месяца до госпитализации была диагностирована COVID-19, подтвержденная ПЦР, при этом IgG и IgM к SARS-CoV-2 не обнару-

Таблица 2 | Table 2

Морфологические изменения легочной ткани в исследованных образцах | Morphological changes in the lung tissue in the studied samples

№ No.	Длительность COVID-19, дней COVID-19 duration, days	Гистологически Histologic	Результаты ИГХ IHC results
Пациенты с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией Patients with newly diagnosed HIV			
1	17	Экссудативно-пролиферативная фаза ДАП Exudative-proliferative phase of DAD ЦМВ + ПЦП CMV + PCP	+++ SARS-CoV-2 (альвеолоциты, гиалиновые мембраны)* +++ SARS-CoV-2 (alveolar cells, hyaline membranes)* + ЦМВ + CMV
2	11	Пролиферативная фаза ДАП Proliferative phase of DAD ЦМВ + ПЦП CMV + PCP	+ SARS-CoV-2 (альвеолоциты)* + SARS-CoV-2 (alveolar cells)* + ЦМВ + CMV
3	12	Экссудативно-пролиферативная фаза ДАП Exudative-proliferative phase of DAD ЦМВ + ПЦП CMV + PCP	+++ SARS-CoV-2 (альвеолоциты, сосуды)* +++ SARS-CoV-2 (alveolar cells, blood vessels)* + ЦМВ + CMV
Пациенты с контролируемой ВИЧ-инфекцией Patients with controlled HIV infection			
4	7	ДВС-синдром DIC syndrome	+ SARS-CoV-2 (сосуды, макрофаги)* + SARS-CoV-2 (blood vessels, macrophages)*
5	10	Экссудативно-пролиферативная фаза ДАП Exudative-proliferative phase of DAD	+ SARS-CoV-2 (сосуды, гиалиновые мембраны)* + SARS-CoV-2 (blood vessels, hyaline membranes)*
6	5	Экссудативная фаза ДАП Exudative phase of DAD	SARS-CoV-2 не обнаружен SARS-CoV-2 not detected

ИГХ – иммуногистохимия, ЦМВ – цитомегаловирус, ПЦП – пневмоцистная пневмония, ДАП – диффузное альвеолярное повреждение, +++ – яркое окрашивание, + – умеренно выраженное окрашивание

*В скобках отмечена локализация положительного ИГХ окрашивания на SARS-CoV-2 |

IHC – immunohistochemistry, CMV – cytomegalovirus, PCP – pneumocystis pneumonia, DAD – diffuse alveolar damage, DIC – disseminated intravascular coagulation, +++ – bright staining, + – moderate staining

*In the parentheses, the location of SARS-CoV-2-positive IHC staining is mentioned

живались, однако достоверно дифференцировать эту ситуацию с повторным инфицированием не представляется возможным, так как недоступно генотипирование образцов вируса при первичном амбулаторном и посмертном исследованиях.

В случае относительной сохранности иммунного статуса на фоне АРТ гистологическая картина разнообразна и сопоставима с морфологическими изменениями легких у ВИЧ-негативных пациентов, возможны разные сочетания фаз ДАП и похожее распределение SARS-CoV-2 в ткани легких (в сосудах и единичных альвеолоцитах) и, вероятно, сопоставим уровень репликации вируса, что отражает интенсивность гистохимических реакций и согласуется с ранее опубликованными наблюдениями [15]. Также можно отметить наблюдение 4 без выраженного альвеолярного повреждения, с преобладанием в морфологической картине признаков ДВС-синдрома, что согласуется с ранее опубликованными данными по описанию «фенотипов» патологических изменений легочной ткани на основании стандартного гистологического исследования в сочетании с конфокальной микроскопией у ВИЧ-негативных пациентов [16]. По всей видимости, при относительной сохранности иммунного статуса наряду с прямым действием SARS-CoV-2 более вероятно реализация опосредованных вирусом реакций, таких как вирусассоциированная коагулопатия [17–20].

Безусловно, важно акцентировать внимание на том, что полученные данные относятся к периоду до широкой циркуляции омикрона и его субвариантов, что, как известно, изменило структуру заболеваемости и смертности от COVID-19 в сторону более легкого клинического течения и уменьшения числа осложнений, главным образом в связи с большей тропностью вируса к эпителию верхних дыхательных путей. Вместе с тем наш авторский коллектив считает, что настоящая работа является ярким примером междисциплинарного подхода и анализа с использованием современных диагностических методов, что важно как для практических аспектов медицинской практики, так и для понимания эволюции и адаптации нового представителя семейства коронавирусов в популяции.

Заключение

В нашем исследовании предпринята попытка детального описания спектра морфологических изменений легочной ткани у ВИЧ/SARS-CoV-2 коинфицированных пациентов при разном уровне выраженности иммунодефицита с использованием современных методик, включая иммуногистохимическое исследование. Применение ИГХ окрашивания позволило локализовать присутствие SARS-CoV-2 в ткани легких коинфицированных, что, по нашему мнению, важно для понимания особенностей течения этих заболеваний. Клинико-иммунологическая неоднородность общей группы при ВИЧ/SARS-CoV-2 коинфекции, за-

кончившейся летальным исходом, находит отражение в патоморфологических изменениях легких. Так, поражение легких при глубоком ВИЧ-ассоциированном иммунодефиците определяется совокупностью действия коронавируса и патогенов-оппортунистов, а при контролируемой ВИЧ-инфекции и относительно сохранном иммунном статусе (CD4+ более 200 кл/мкл) морфологическая картина сопоставима с изменениями легких у ВИЧ-негативных пациентов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Мозгалева, Н.В. Глухоедова.

Сбор и обработка материала – М.А. Самсонова, Н.В. Мозгалева, Н.В. Глухоедова, П.А. Ведяпин, А.С. Жиленкова, О.А. Тишкевич.

Написание текста – Н.В. Глухоедова, Н.В. Мозгалева.

Редактирование – Ю.Г. Пархоменко, А.Л. Черняев, М.А. Самсонова, Е.В. Цыганова, А.И. Мазус.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Mozgaleva, N.V. Glukhoedova.

Collected the data and performed the analysis – M.V. Samsonova, N.V. Mozgaleva, N.V. Glukhoedova, P.A. Vedyapin, A.S. Zhilenkova, O.A. Tishkevich.

Wrote the paper – N.V. Glukhoedova, N.V. Mozgaleva.

Edited the manuscript – Y.G. Parkhomenko, A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, E.V. Tsyganova, A.I. Mazus.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Мазус А.И., Цыганова Е.В., Жиленкова А.С., Глухоедова Н.В., Гейне М.Д., Аникина Ю.А. и др. Иммунологические аспекты и особенности когорты умерших пациентов с коинфекцией ВИЧ/COVID-19. Журнал инфектологии. 2022;14(5):26–34. DOI: 10.22625/2072-6732-2022-14-5-26-34.
Mazus AI, Tsyganova EV, Zhilenkova AS, Glukhoedova NV, Geyne MD, Anikina YA et al. Immunological aspects of the lethal HIV/COVID-19 coinfecting cohort. Journal Infectology. 2022;14(5):26–34 (In Russ.). DOI: 10.22625/2072-6732-2022-14-5-26-34.
2. Пархоменко Ю.Г., Черняев А.Л., Ведяпин П.А., Мозгалева Н.В., Омарова Ж.Р., Тишкевич О.А. и др. Изменения легких при сочетании ВИЧ-инфекции и COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(2):71–77. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.71-77.
Parkhomenko YG, Chernyaev AL, Vedyapin PA, Mozgaleva NV, Omarova ZR, Tishkevich OA et al. Lung changes in a patient with combination of HIV infection and COVID-19. Clinical and experimental morphology. 2022;11(2):71–77 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.71-77.
3. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res.* 2020;69(3):379–88. DOI: 10.33549/physiolres.934492.
4. Shi Y, Wang Y, Shao C, Huang J, Gan J, Huang X et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ.* 2020;27(5):1451–4. DOI: 10.1038/s41418-020-0530-3.

5. Moon C. Fighting COVID-19 exhausts T cells. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):277. DOI: 10.1038/s41577-020-0304-7.
6. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861–80. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
7. Ryan FJ, Hope CM, Masavuli MG, Lynn MA, Mekonnen ZA, Yeow AEL et al. Long-term perturbation of the peripheral immune system months after SARS-CoV-2 infection. *BMC Med*. 2022;20(1):26. DOI: 10.1186/s12916-021-02228-6.
8. Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.
Somova LM, Kotsyurbiy EA, Drobot EI, Lyapun IN, Shchelkanov MYu. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical and experimental morphology*. 2021;10(1):11–20 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.
9. Stein SR, Ramelli SC, Grazioli A, Chung JY, Singh M, Yinda CK et al. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature*. 2022;612(7941):758–63. DOI: 10.1038/s41586-022-05542-y.
10. Dao TL, Hoang VT, Gautret P. Recurrence of SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients: a narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(1):13–25. DOI: 10.1007/s10096-020-04088-z.
11. Desimmie BA, Raru YY, Awadh HM, He P, Tekas S, Willenburg KS. Insights into SARS-CoV-2 persistence and its relevance. *Viruses*. 2021;13(6):1025. DOI: 10.3390/v13061025.
12. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL et al. Case study: prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. *Cell*. 2020;183(7):1901–12.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.049.
13. Zhang L, Richards A, Barrasa MI, Hughes SH, Young RA, Jaenisch R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(21):e2105968118. DOI: 10.1073/pnas.2105968118.
14. Smits N, Rasmussen J, Bodea GO, Amarilla AA, Gerdes P, Sanchez-Luque FJ et al. No evidence of human genome integration of SARS-CoV-2 found by long-read DNA sequencing. *Cell Rep*. 2021;36(7):109530. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109530.
15. Самсонова М.В., Белоцерковская М.М., Черняев А.Л., Талалаев А.Г., Омарова Ж.Р., Лебедин Ю.С. Цитокиновый шторм при COVID-19: аутопсийное наблюдение. Практическая пульмонология. 2021;3:33–39. DOI: 10.24412/2409-6636-2021-12422.
Samsonova MV, Belocerkovskaya MM, Chernyaev AL, Talalae AG, Omarova Zhr, Lebedin YS. Cytokine storm associated with COVID-19: the autopsy case. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical pulmonology*. 2021;3:33–39 (In Russ.). DOI: 10.24412/2409-6636-2021-12422.
16. Valdebenito S, Bessis S, Annane D, Lorin de la Grandmaison G, Cramer-Bordé E, Prideaux B et al. COVID-19 lung pathogenesis in SARS-CoV-2 autopsy cases. *Front Immunol*. 2021;12:735922. DOI: 10.3389/fimmu.2021.735922.
17. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
18. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033–4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
19. Zanza C, Romenskaya T, Manetti AC, Franceschi F, La Russa R, Bertozzi G et al. Cytokine storm in COVID-19: immunopathogenesis and therapy. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(2):114. DOI: 10.3390/medicina58020144.
20. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерibas В.Ю., Тодоров С.С. (мл.). Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.
Todorov SS, Kazmin AS, Deribas VYu, Todorov S.S. (Jr.). Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19. *Clinical and experimental morphology*. 2022;11(2):6–12 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.

Информация об авторах

Наталья Владимировна Мозгалева – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Юрий Георгиевич Пархоменко – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына 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 РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Мария Викторовна Самсонова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии НИИ пульмонологии ФМБА России, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУЗ МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ.

Павел Александрович Ведяпин – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Наталья Владимировна Глухоедова – кандидат медицинских наук, врач-инфекционист научно-клинического отдела Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом.

Александра Сергеевна Жиленкова – врач-инфекционист научно-клинического отдела Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом.

Елена Валерьевна Цыганова – кандидат медицинских наук, заведующая научно-клиническим отделом Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом.

Олег Александрович Тишкевич – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения инфекционной клинической больницы № 2.

Алексей Израилевич Мазус – доктор медицинских наук, профессор, главный внештатный специалист по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции МЗ РФ и ДЗМ, руководитель Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом.

Author information

Natalia V. Mozgaleva – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Pathology Department, Infectious Diseases Hospital No. 2.
<https://orcid.org/0000-0002-4416-6884>

Yury G. Parkhomenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Head of the Pathology Department, Infectious Diseases Hospital No. 2.
<https://orcid.org/0000-0001-9857-3402>

Andrey L. Chernyaev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Fundamental Pulmonology Department, Pulmonology Scientific Research Institute; Professor, Department of Pathology and Clinical Pathology, Pirogov Russian National Research Medical University; Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-0973-9250>

Maria V. Samsonova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Laboratory, Pulmonology Scientific Research Institute; Senior Researcher, Pathomorphology Department, The Loginov Moscow Clinical Scientific Center.
<http://orcid.org/0000-0001-8170-1260>

Pavel A. Vedyapin – Pathologist, Pathology Department, Infectious Diseases Hospital No. 2.
<https://orcid.org/0000-0002-4194-0272>

Natalia V. Glukhoedova – Cand. Sci. (Med.), Infectionist, Scientific and Clinical Department, Moscow Centre for HIV/AIDS Prevention and Treatment.
<https://orcid.org/0000-0003-2414-6103>

Aleksandra S. Zhilenkova – Infectionist, Scientific and Clinical Department, Moscow Centre for HIV/AIDS Prevention and Treatment.
<https://orcid.org/0000-0001-8139-4061>

Elena V. Tsyganova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Scientific and Clinical Department, Moscow Centre for HIV/AIDS Prevention and Treatment.
<https://orcid.org/0000-0002-3410-2510>

Oleg A. Tishkevich – Pathologist, Pathology Department, Infectious Diseases Hospital No. 2.
<https://orcid.org/0000-0002-0789-7709>

Alexey I. Mazus – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Specialist on Diagnosis and Treatment of HIV Infection of the Moscow Healthcare Department, Head of the Moscow Centre for HIV/AIDS Prevention and Treatment.
<https://orcid.org/0000-0003-2581-1443>

Клинико-морфологические особенности патологии миокарда и тромботической микроангиопатии у пациентов с COVID-19

А.С. Конторщиков¹, М.А. Кунижева², Е.П. Батракова², З.Б. Джафарова², О.А. Васюкова¹, С.А. Карпушов³, В.В. Варясин⁴, Э.Э. Бережная⁴, Л.В. Кактурский¹, Л.М. Михалева^{1,3}

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

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, России

Резюме. *Введение.* Патологические изменения в миокарде и признаки тромботической микроангиопатии (ТМА) при COVID-19 и сегодня остаются актуальной и малоизученной проблемой. Клинически диагностированный миокардит не всегда подтверждался на аутопсии. Целью настоящего исследования является комплексная оценка клинических и патоморфологических изменений в миокарде и ТМА у пациентов с COVID-19 во время четвертой инфекционной вспышки.

Материалы и методы. Проанализированы клинические и патологоанатомические данные 11 пациентов с COVID-19 с диагностированным миокардитом по результатам Эхо-КГ и ЭКГ: в семи случаях оценивались клинические показатели, а в пяти – проведено комплексное клинико-морфологическое аутопсийное исследование. Также проанализированы данные коагулограммы и количества тромбоцитов для оценки ТМА.

Результаты. При патологоанатомическом исследовании аутопсийного материала выявлена гипертрофия кардиомиоцитов с признаками миоцитолиза. Гистохимическим окрашиванием по Маллори и по Ли, иммуногистохимическими (ИГХ) реакциями с антителами к CD3, CD4, CD8, CD20, CD45 и CD68, а также подсчетом лимфоцитов был подтвержден миокардит с лимфоцитарной инфильтрацией в строме миокарда с единичными полиморфноядерными лейкоцитами, наличием фиброзной ткани и присутствием поврежденных кардиомиоцитов.

Заключение. Золотым стандартом для объективной диагностики истинного миокардита являются магнитно-резонансная томография (МРТ) с применением контраста и эндомикардиальная биопсия с ИГХ. Полученные нами морфологические данные в сопоставлении с клиническими показателями могут быть полезными как для прижизненной, так и постмортальной диагностики миокардита и тромботической микроангиопатии.

Ключевые слова: миокардит, новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, тромботическая микроангиопатия, патоморфология, ИГХ, ПЦР

Для корреспонденции: Андрей Сергеевич Конторщиков. E-mail: andreistr.ru@mail.ru

Для цитирования: Конторщиков А.С., Кунижева М.А., Батракова Е.П., Джафарова З.Б., Васюкова О.А., Карпушов С.А., Варясин В.В., Бережная Э.Э., Кактурский Л.В., Михалева Л.М. Клинико-морфологические особенности патологии миокарда и тромботической микроангиопатии у пациентов с COVID-19. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):14–23. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.14-23.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 11.10.2023. Получена после рецензирования 26.10.2023. Принята в печать 20.11.2023.

Clinical and morphological features of myocarditis pathology and thrombotic microangiopathy in COVID-19 patients

A.S. Kontorshchikov¹, M.A. Kunizheva², E.P. Batrakova², Z.B. Dzhafarova², O.A. Vasyukova¹, S.A. Karpushov³, V.V. Varyasin⁴, E.E. Berezhnaya⁴, L.V. Kakturskiy¹, L.M. Mikhaleva^{1,3}

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

⁴ City Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Clinical and morphological aspects of myocardial pathology and thrombotic microangiopathy (TMA) in COVID-19 were studied a little due to the tense epidemiological situation

in the COVID-19 pandemic. The aim of the study was to give a comprehensive assessment of clinical and morphological pathological features of the myocardium in patients with COVID-19 in the fourth wave of the infection.

Materials and methods. We analyzed clinical and morphological data in 11 patients with clinically diagnosed myocarditis according to the echocardiography and electrocardiography (ECG) findings. In 7 cases, we evaluated antemortem clinical results, and in 5 cases, we performed a complex clinical and morphological autopsy study. We also assessed TMA using coagulogram results and platelet count data.

Results. Pathological evaluation revealed cardiomyocyte hypertrophy with myocytolysis. Using histochemical methods (Mallory and Lee stains) and IHC assays with antibodies to CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, and CD68 we confirmed the lymphocytic infiltrate in the myocardial stroma with single leukocytes, fibrosis foci, and damaged cardiomyocytes.

Conclusion. MRI with contrast and endomyocardial biopsy (EMB) with IHC assay are the gold standard to diagnose myocarditis. The obtained data enable us to assess clinical and laboratory diagnosis of myocarditis and TMA more thoroughly as well as modify treatment.

Keywords: myocarditis, coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, thrombotic microangiopathy, pathomorphology, IHC, PCR

For correspondence: Andrei S. Kontorshchikov. E-mail: andreistr.ru@mail.ru

For citation: Kontorshchikov A.S., Kunizheva M.A., Batrakova E.P., Dzhafarova Z.B., Vasyukova O.A., Karpushov S.A., Varyasin V.V., Berezhnaya E.E., Kakturskiy L.V., Mikhaleva L.M. Clinical and morphological features of myocarditis pathology and thrombotic microangiopathy in COVID-19 patients. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):14–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.14-23.

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

Received 11.10.2023. **Received in revised form** 26.10.2023. **Accepted** 20.11.2023.

Введение

Миокардит – это воспалительное заболевание сердечной мышцы неишемического характера инфекционной или аутоиммунной природы с повреждением кардиомиоцитов с клиническими проявлениями от бессимптомного течения вплоть до жизнеугрожающих нарушений ритма и внезапной сердечной смерти [1–4]. Прижизненное патоморфологическое исследование миокарда для подтверждения миокардита, согласно международным критериям Далласа, рекомендациям Европейского общества кардиологов, выполняется с соответствующей панелью антител и дополнительных методов окрашивания для выявления в миокарде на площади 1 мм² не менее 7 CD3⁺ лимфоцитов и не менее 14 CD45⁺ лейкоцитов, а также наличия фиброза и повреждения кардиомиоцитов [1].

Целью настоящего исследования явилась патоморфологическая диагностика изменений миокарда в сопоставлении с клиническими данными, а также оценка развития тромботической микроангиопатии (ТМА) при новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

Проанализированы данные клинических и патологоанатомических исследований 11 пациентов с COVID-19, подтвержденной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, и с клинически диагностированным миокардитом по результатам Эхо-КГ и ЭКГ, а также данные коагулограмм для оценки развития тромботической микроангиопатии и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), предложенной

Международным обществом по изучению тромбоза и гемостаза [5]. Все госпитализированные пациенты подписывали форму добровольного информированного согласия, а патологоанатомические вскрытия проводились в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 354н от 06.06.2013 «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий».

Прижизненно миокардит был диагностирован у пациентов, госпитализированных в инфекционные отделения Университетской клинической больницы № 4 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Первую группу исследования составили семь пациентов (мужчины/женщины – 3:4) (средний возраст – 64,9±12,16 года, диапазон от 45 до 92 лет), три из которых скончались в результате прогрессирования осложнений, развившихся в результате новой коронавирусной инфекции в период с июля по ноябрь 2021 года. Длительность госпитализации в первой группе в среднем составила 12,9 суток (диапазон 3–16 дней), а продолжительность болезни колебалась от 11 до 52 дней (средняя – 22,6 дня). Вторую группу составили пять аутопсийных случаев с клинически диагностированным миокардитом (мужчины/женщины – 1:4, средний возраст 74,4±18,54 года, диапазон от 45 лет до 91 года). Постмортальные исследования умерших в результате осложнений COVID-19 проводились в период с июня по август 2021 года. Длительность госпитализации до летального исхода составила от 1 до 11 суток (в среднем 3,8 дня), период персистенции вируса по данным ПЦР – 6±3,3 суток.

Для патоморфологических исследований, проводившихся в патологоанатомическом отделении ГКБ № 52, в пяти аутопсийных случаях из 12 брали фрагменты миокарда, фиксировали в забуференном 10% растворе формалина, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 3 мкм с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином, с гистохимическим окрашиванием по Маллори и Ли. ИГХ исследование выполнялось с антителами к CD3 (поликлональные), CD4 (клон SP35), CD8 (клон SP57), CD20 (клон L26), CD45 (клон MB1) и CD68 (клон KP-1) (Leica Biosystems, Германия), а также с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (клон HL257) (GeneTex, США) для выявления вируса в миокарде.

Результаты

Клинико-лабораторный анализ патологии миокарда и тромботической микроангиопатии при COVID-19

В первой группе исследования у всех пациентов на момент госпитализации были жалобы на слабость, непродуктивный кашель, субфебрильную или фебрильную температуру тела, потерю обоняния, озноб и одышку при минимальной физической нагрузке. Всем пациентам делали ЭКГ (табл. 1) и выполняли Эхо-КГ во время нахождения в инфекционном стационаре (табл. 2, рис. 1 А, В). При анализе 10 критериев ЭКГ и Эхо-КГ, согласно которым можно клинически подтвердить миокардит, у пациента № 1 – 4/10 (40%) вероятность наличия миокардита, № 2 – 4/10 (40%), № 3 – 8/10 (80%), № 4 – 5/10 (50%), № 5 – 6/10 (60%), № 6 – 5/10 (50%), № 7 – 3/10 (30%).

Одним из смертельных осложнений новой коронавирусной инфекции, согласно данным зарубежных коллег, стало развитие ТМА, в связи с чем у этой группы пациентов нами были оценены коагулограммы и количество тромбоцитов (табл. 3).

Так как ТМА может осложниться ДВС-синдромом, мы произвели балльную оценку риска его развития, предложенную Международным обществом по изучению тромбоза и гемостаза (табл. 4).

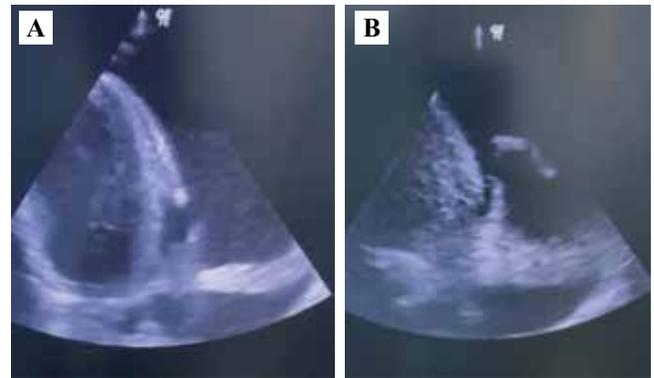


Рис. 1. Фрагмент записи Эхо-КГ.

А – плевральный выпот с наложениями фибрина (пациент № 3). В – перикардиальный выпот, повышение эхогенности миокарда (пациент № 4)

Fig. 1. Echocardiography image.

А – pleural effusion with deposits of fibrin (patient No. 3). В – pericardial effusion (patient No. 4)

Таблица 1 | Table 1

Данные ЭКГ у пациентов с COVID-19 | ECG findings in patients with COVID-19

Критерий Data	№ пациента Patient No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Электрическая ось сердца Electrical cardiac axis	Нормальная Normal	Отклонена влево Left axis deviation	Отклонена влево Left axis deviation	Нормальная Normal	Отклонена влево Left axis deviation	Нормальная Normal	Нормальная Normal
Интервал QT (сек.) / интервал скорректированного QT (мс) Reference value (RV) <0.42	0,40–0,46	0,4–0,46	0,32–0,46	0,38–0,44/ 0,46–0,5	0,28–0,3	0,34–0,4	0,32–0,48
Отрицательный зубец Т Inverted T wave	+			+	+	+	
Желудочковые экстрасистолы (ЖЭ) Premature ventricular contraction (PVC)			+			+	+

Таблица 2 | Table 2

**Функциональные изменения сердца у пациентов с COVID-19 по данным Эхо-КГ |
Echocardiography functional changes in patients with COVID-19**

Критерий Data	№ пациента Patient No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Дилатация камер сердца Dilated chambers of the heart			+			+	
Фракция выброса левого желудочка (%) Left ventricular ejection fraction (LVEF) (%) P3 RV >55	60–62	59	15–35	58–60	26–30	38–58	57–63
Митральная регургитация Mitral regurgitation	+	+	+	+	+	+	+
Нарушения сократимости левого желудочка Affected left ventricular contraction	+		+		+		
Сепарация листков перикарда Separated pericardial layers			+	+	+		

Таблица 3 | Table 3

Данные коагулограмм и количество тромбоцитов | Coagulation profile and platelet count data

Проба Test	№ пациента Patient No.							Референсное значение Reference value
	1	2	3	4	5	6	7	
МНО (отн. ед.) INR (RU)	1,05	0,95	1,31	1,31	1,81	1,47	0,91	1,15–0,87
АЧТВ (сек.) APPT (sec.)	51,9	37,3	41,2	37,5	95,5	61,4	56,7	25,1–36,5
Протромбиновый индекс (%) Prothrombin time ratio (%)	102	85	59	59	38	68	93	95–105
D-димер (мкг FEU/мл) D-dimer (mkg FEU/ml)	1,14	0,43	4,67	1,83	2,08	11,28	4,96	<0,5
Фибриноген (г/л) Fibrinogen (g/l)	–	–	7,02	1,13	7,99	4,58	6–83	2–4
Тромбоциты ($\times 10^9/л$) Platelets ($\times 10^9/l$)	261	108	80	34	159	140	110	180–320

МНО – международное нормализованное отношение, отн. ед. – относительные единицы, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

INR – international normalized ratio, RU – relative unit, APPT – activated partial thromboplastin time

Таблица 4 | Table 4

**Оценка развития ДВС-синдрома в исследуемой группе |
Assessment of the disseminated intravascular coagulation (DIC) syndrome development in the studied group**

№ пациента Patient No.	Результаты лабораторных исследований Laboratory test results	Сумма баллов Total score
1	Тромбоциты $>100 \times 10^9/л$ = 0 баллов Platelets $>100 \times 10^9/l$ = 0 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, отсутствует = 0 баллов No increased factors associated with fibrin production = 0 points Фибриноген – нет данных Fibrinogen – no data	2
2	Тромбоциты $>100 \times 10^9/л$ = 0 баллов Platelets $>100 \times 10^9/l$ = 0 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, отсутствует = 0 баллов No increased factors associated with fibrin production = 0 points Фибриноген – нет данных Fibrinogen – no data	0
3	Тромбоциты $<100 \times 10^9/л$ = 1 балл Platelets $<100 \times 10^9/l$ = 1 point Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, – значительно повышены = 3 балла Increased factors associated with fibrin production – significantly elevated = 3 points Фибриноген ≤ 10 г/л = 1 балл Fibrinogen ≤ 10 g/l = 1 point	5
4	Тромбоциты $<50 \times 10^9/л$ = 2 балла Platelets $<50 \times 10^9/l$ = 2 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, – умеренно повышены = 2 балла Increased factors associated with fibrin production – moderately increased = 2 points Фибриноген ≤ 10 г/л = 1 балл Fibrinogen ≤ 10 g/l = 1 point	5
5	Тромбоциты $>100 \times 10^9/л$ = 0 баллов Platelets $>100 \times 10^9/l$ = 0 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, – значительно повышены = 3 балла Increased factors associated with fibrin production – significantly increased = 3 points Фибриноген ≤ 10 г/л = 1 балл Fibrinogen ≤ 10 g/l = 1 point	4

Таблица 4 (окончание) | Table 4 (end)

№ пациента Patient No.	Данные Laboratory test results	Сумма баллов Total score
6	Тромбоциты $>100 \times 10^9/\text{л}$ = 0 баллов Platelets $>100 \times 10^9/\text{л}$ = 0 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, – значительно повышены = 3 балла Increased factors associated with fibrin production – significantly increased = 3 points Фибриноген ≤ 10 г/л = 1 балл Fibrinogen ≤ 10 g/l = 1 point	4
7	Тромбоциты $>100 \times 10^9/\text{л}$ = 0 баллов Platelets $>100 \times 10^9/\text{л}$ = 0 points Повышение факторов, связанных с продукцией фибрина, – значительно повышены = 3 балла Increased factors associated with fibrin production – significantly increased = 3 points Фибриноген ≤ 10 г/л = 1 балл Fibrinogen ≤ 10 g/l = 1 point	4

Примечание. Мы не считали баллы протромбинового времени, так как у нас имелись данные только протромбинового индекса. Интерпретация суммы баллов развития ДВС-синдрома: ≥ 5 баллов – диагноз достоверен, < 5 баллов – диагноз предполагаемый. Note. We did not count prothrombin time scores because we had only prothrombin index data. The interpretation of the total score for the DIC syndrome development: the diagnosis is reliable (≥ 5 points) and the diagnosis is presumptive (< 5 points)

Патоморфологические особенности миокарда и тромботической микроангиопатии кровеносных сосудов в остром периоде COVID-19

Далее проанализированы аутопсийные случаи с клинически диагностированным миокардитом в пяти наблюдениях (один мужчина – наблюдение Д и четыре женщины – наблюдения А–Г). Наблюдение А соответствует пациенту №5, клинические данные которого приведены выше и который послужит связующим звеном характеристики клинико-лабораторных и данных аутопсийного исследования.

Макроскопически размеры и масса сердца в среднем составили $10,7 \times 12 \times 5,14$ см и $358,8 \pm 60$ г, соответственно. Полости сердца были расширены во всех наблюдениях. Плотность миокарда у разных пациентов варьировала от дряблой до плотной, а цвет – от бледно-коричневого до желтовато-красного. В четырех из пяти

случаев были описаны диффузные прослойки серватой ткани и неравномерные участки кровенаполнения, в пятом – постинфарктный кардиосклероз.

При патоморфологическом исследовании миокарда отмечены гипертрофия кардиомиоцитов с перинуклеарными отложениями гранул липофусцина, диссоциация кардиомиоцитов, очаги исчезновения поперечной исчерченности в кардиомиоцитах и участки гиперэозинофилии цитоплазмы с очаговой мононуклеарной инфильтрацией стромы с единичными лейкоцитами (рис. 2 А, В). При гистохимическом окрашивании по Маллори выявлены множественные разрастания фиброзной ткани (рис. 3 А), а при гистохимическом окрашивании по Ли найдены контрактурные повреждения кардиомиоцитов (рис. 3 В). Кроме того, наблюдались умеренный интерстициальный отек стромы с очаговыми кровоизлияниями, фиброэластоз стенок кровенос-

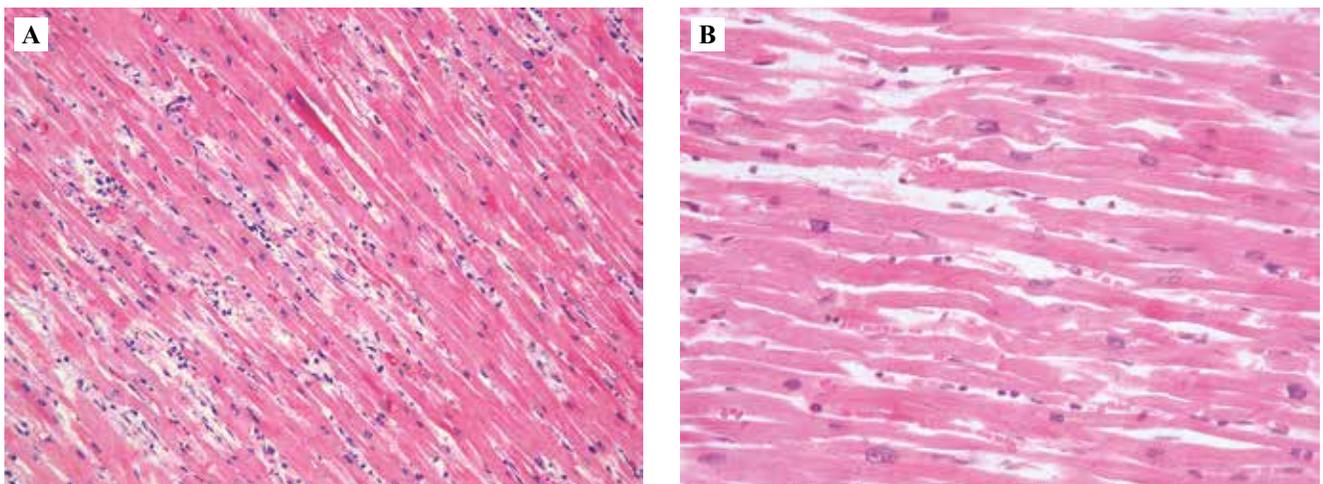


Рис. 2. Патоморфологическая характеристика миокарда.

А – гипертрофия кардиомиоцитов с очаговой мононуклеарной инфильтрацией отечной стромы, единичные контрактурные повреждения кардиомиоцитов. В – единичные контрактурные повреждения кардиомиоцитов, отек стромы миокарда, мононуклеарные клетки в строме. Окраска гематоксилином и эозином. А $\times 200$, В $\times 400$

Fig. 2. Pathology of the myocardium.

А – cardiomyocyte hypertrophy with focal mononuclear infiltration of the edematous stroma, single hypercontraction bands. В – single hypercontraction bands, mononuclear cells in stroma, H&E stain. А $\times 200$, В $\times 400$

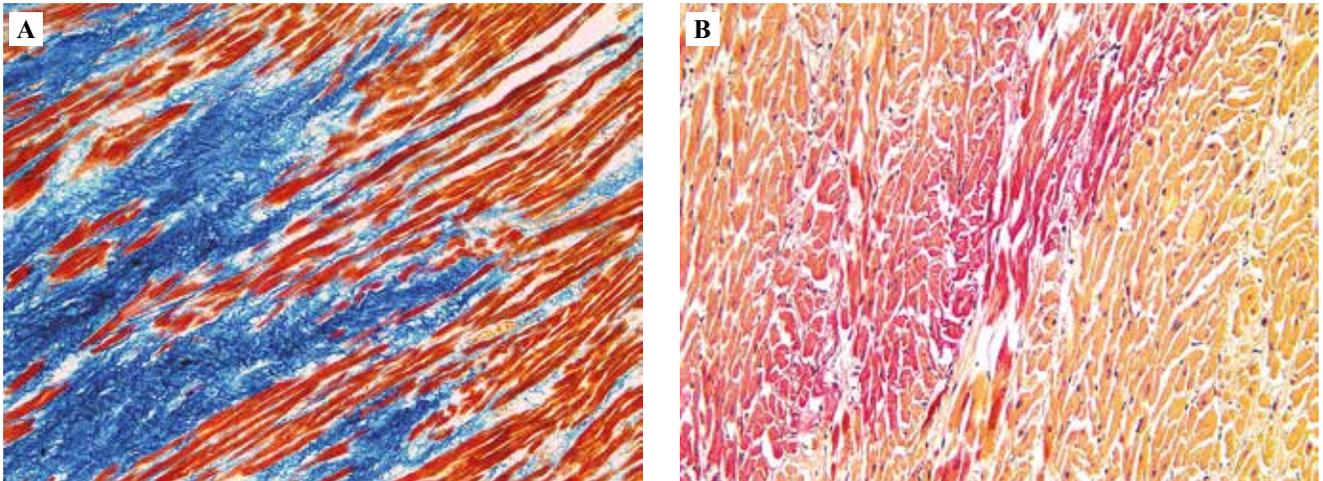


Рис. 3. Патоморфологическая характеристика миокарда.

А – очаги фиброзной ткани в миокарде. Окраска по Маллори. $\times 100$. В – контрактурные повреждения кардиомиоцитов (окрашены в красный цвет). Окраска по Ли. $\times 200$

Fig. 3. Pathology of the myocardium.

А – fibrotic foci in the myocardium. Mallory's trichrome stain. $\times 100$. В – hypercontracted lesions in cardiomyocytes (red staining). Lie staining. $\times 200$

ных сосудов с их полнокровием. В одном наблюдении обнаружен микроабсцесс с наличием в гнойном экссудате мицелия гриба.

Интерстициальный миокардит при патоморфологическом исследовании был диагностирован в трех из пяти наблюдений. Заболевание подтверждено после-

дующим ИГХ исследованием с соответствующей панелью антител, согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов для диагностики миокардита.

При проведении ИГХ исследования с панелью антител были получены следующие данные (табл. 5, рис. 4).

Таблица 5 | Table 5

Анализ результатов ИГХ реакции в миокарде умерших от COVID-19 пациентов |
Myocardium IHC assays results in patients with COVID-19

Признаки Features	Наблюдение Case				
	А	Б	В	Г	Д
Перицеллюлярные разрастания фиброзной ткани Pericellular growth of fibrous tissues	+	+	+	+	–
Исчезновение поперечной исчерченности Loss of striation	–	+	+	+	+
Лимфоцитарная инфильтрация стромы* Stromal lymphocytic infiltration*	–	++	++	++	+
CD3+ Т-лимфоциты, >7 клеток на 1 мм ² CD3+ T lymphocytes, >7 cells per 1 mm ²	–	+	+	+	+/-
CD4+ Т-лимфоциты CD4+ T lymphocytes	–	+/-	+	+	+
CD8+ Т-лимфоциты CD8+ T lymphocytes	–	+/-	+	–	+
CD20+ В-лимфоциты CD20+ T lymphocytes	–	–	–	–	–
CD45+ панлейкоциты, >14 клеток на 1 мм ² CD45+ pan-leukocytes, >14 cells per 1 mm ²	–	+	+	+	+
CD68+ макрофаги CD68+ macrophages	–	+	+	+	+
Микроабсцесс с наличием в гнойном экссудате мицелия гриба Microabscess with fungal mycelium in the exudate	–	–	–	–	+

* + – очаговая инфильтрация | focal infiltration

++ – диффузная инфильтрация | diffuse infiltration

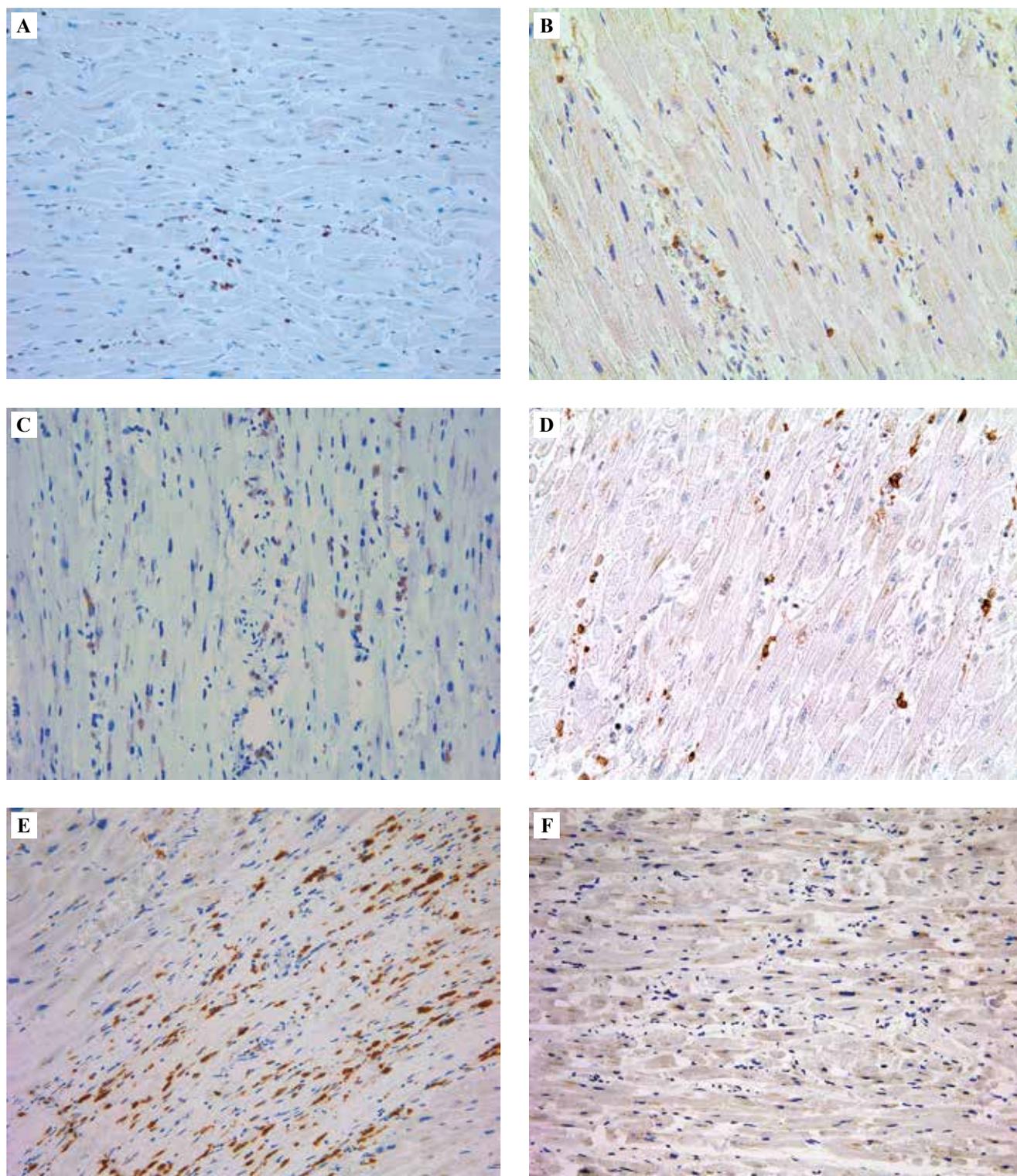


Рис. 4. Клеточный состав воспалительного инфильтрата миокарда.

А – CD3+ лимфоциты, В – CD4+ лимфоциты, С – CD8+ лимфоциты, D – CD45+ лейкоциты, E – CD68+ макрофаги, F – CD20+ лимфоциты. ИГХ реакция. $\times 200$

Fig. 4. Cell composition of the myocardial inflammatory infiltrate.

A – CD3+ lymphocytes, B – CD4+ lymphocytes, C – CD8+ lymphocytes, D – CD45+ lymphocytes, E – CD68+ macrophages, F – CD20+ lymphocytes. IHC assay. $\times 200$

Обсуждение

Наряду с патологией верхних дыхательных путей в остром периоде заболевания [6–8] у пациентов с новой коронавирусной инфекцией диагностируется достаточно широкий спектр заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе миокардит [9–14].

Анализ данных ЭКГ показывает, что у каждого госпитализированного пациента с клинически подтвержденной новой коронавирусной инфекцией есть как минимум два из пяти критериев, соответствующих наличию миокардита. Сепарация листков перикарда может свидетельствовать о развитии миоперикардита. Описанные нами изменения Эхо-КГ совпадают с данными P.T. Kariyanna et al., которые выявили участки гипокинеза с нормальной или гипердинамической сократимостью стенок левого желудочка и умеренно сниженной фракцией выброса, а также дилатацию полостей сердца во время пандемии COVID-19 [15].

Согласно исследованию J.T. Merrill et al., тромботический синдром в данном случае может быть SARS-CoV-2 комплемент-опосредованной ТМА с цитокиновым штормом либо без него [16]. Данные о повышении фибриногена подтверждают гиперкоагуляционное состояние. Мы не располагали данными о протромбиновом времени у всех пациентов и о концентрации фибриногена – в наблюдениях № 1 и № 2. Исходя из результатов балльной оценки развития ДВС-синдрома, предложенной Международным обществом по изучению тромбоза и гемостаза [5] (табл. 4), и других показателей коагулограммы, а именно АЧТВ (удлиненного во всех случаях), мы не можем исключить вероятность того, что все пациенты находились в группе риска развития острой ТМА, а у пациентов № 3 и № 4 смогла развиться острая ТМА. Полученные данные можно расценить как гиперкоагуляционную фазу ДВС-синдрома, но удлинение АЧТВ свидетельствует о ее переходе в фибринолитическую [17].

Как правило, миокардит гипердиагностируется на клиническом этапе, что и подтвердилось в нашей работе. На аутопсии наблюдения А (пациент № 5) с прижизненно диагностированным миокардитом с последующим комплексным патологоанатомическим исследованием данные за миокардит не получены.

При проведении патоморфологического и ИГХ исследований, согласно критериям Далласа и Европейского общества кардиологов, были получены результаты, подтверждающие миокардит в трех из пяти наблюдений. Необходимо принять во внимание, что наличие положительной реакции CD45+ следует расценивать как пролиферацию иммунных клеток, так как высокая экспрессия CD45+ на поверхности клеток характерна для зрелых лимфоцитов. Так, у группы пациентов в остром периоде заболевания определяется положительная реакция с маркерами CD8+ и CD45+ лимфоцитами, что отражает наличие цитотоксических Т-лимфоцитов, одной из функций которых является элиминация инфицированных вирусных клеток путем

экспрессии гранзима А и лиганда FAS [16]. В четырех случаях была положительная реакция с маркерами CD4 и CD45, которая свидетельствует об усилении иммунного ответа и играющего ключевую роль в активации главного комплекса гистосовместимости II типа. Положительное окрашивание с маркером CD68, свидетельствующее о наличии макрофагов, которые были распределены в интерстициальном пространстве диффузно вблизи мелких кровеносных сосудов, можно расценить как реакцию на некроз кардиомиоцитов [18]. В одном наблюдении мононуклеарная инфильтрация обусловлена наличием мицелия гриба в миокарде, являющимся проявлением микотического сепсиса. В другом наблюдении ИГХ окрашивание с панелью антител было отрицательным. При проведении ИГХ исследования маркеров CD20+ (В-лимфоциты) и S-белка SARS-CoV-2 реакция отсутствовала во всех наблюдениях.

При анализе данных коагулограммы и микроскопического исследования аутопсийного материала не возникает разногласий о совпадении интерпретации коагулограммы с изменениями, свидетельствующими о 3-й (гипокоагуляция с генерализованной активацией фибринолиза) и 4-й (полное несвертывание крови) стадиях ДВС-синдрома [19]. Во всех наблюдениях при микроскопическом исследовании миокарда в просветах ветвей венечных артерий микротромбы не выявлены: сосуды были паретически расширены, просветы либо полнокровны, либо пусты.

Частота миокардита (воспалительной кардиомиопатии, обусловленной персистенцией вируса SARS-CoV-2 в макроорганизме, при положительном результате ПЦР исследования), по данным наших коллег, составляет 10–18,5%, при условии, что изменения миокарда являлись находками при аутопсии, в то время как при клинически диагностированном миокардите частота подтверждения клинического диагноза патологоанатомическим исследованием с применением гистохимического окрашивания и ИГХ в нашей работе составила 60%. Стоит отметить, что столь большой процент миокардита обусловлен малой выборкой. Для более точного понимания развития данной патологии у инфицированных вирусом SARS-CoV-2 пациентов необходим анализ большей когорты.

Заключение

По результатам клинико-лабораторных и патологоанатомических сопоставлений показано, что результаты ЭКГ и Эхо-КГ без морфологических данных не всегда объективно свидетельствуют о наличии миокардита у пациентов с COVID-19. Для подтверждения диагноза «миокардит» необходимо проводить МРТ с применением контраста гадолиния и морфологическое (прижизненное или посмертное) исследование, дополненное иммуногистохимическим исследованием тканей фрагментов материала, согласно международным критериям Далласа, рекомендациям Европейско-

го общества кардиологов. Полученные нами данные продемонстрировали клинико-морфологические проявления миокардита у пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Предметом последующих исследований является раскрытие механизмов повреждения миокарда при новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2), так как нет достоверных данных о повреждении миокарда, обусловленном прямым действием вирусных частиц на кардиомиоциты, либо об опосредованном повреждении в результате развития цитокинового шторма.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, Л.В. Кактурский.

Сбор и обработка материала – С.А. Карпушов, Е.П. Батракова, З.Б. Джафарова, М.А. Кунижева, Э.Э. Бережная, В.В. Варясин.

Написание текста – А.С. Конторщиков, О.А. Васюкова.

Редактирование – Л.М. Михалева, Л.В. Кактурский.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, L.V. Kakturskiy.

Collected the data and performed the analysis – S.A. Karpushov, E.P. Batrakov, Z.B. Dzhabarova, M.A. Kunizheva, E.E. Berezhnaya, V.V. Varyasin.

Wrote the paper – A.S. Kontorschikov, O.A. Vasyukova.

Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, L.V. Kakturskiy.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histology, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev.* 2013;18(6):673–81. DOI: 10.1007/s10741-012-9355-6.
2. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A et al. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(9):779–92. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.09.074.
3. Диагностика и лечение миокардитов. Клинические рекомендации. Москва, 2019. Доступно по ссылке: http://cardio-eur.asia/media/files/clinical_recommendations/2019_rus.pdf. Diagnosis and treatment of myocarditis. Clinical guidelines. Moscow, 2019 (In Russ.). Available from: http://cardio-eur.asia/media/files/clinical_recommendations/2019_rus.pdf.
4. Миокардиты. Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2020. Доступно по ссылке: https://scardio.ru/content/Guidelines/2020/Clinic_rekom_Miokardit-unlocked.pdf. Myocarditis. Clinical guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation, 2020 (In Russ.). Available from: https://scardio.ru/content/Guidelines/2020/Clinic_rekom_Miokardit-unlocked.pdf.
5. Erez O, Novack L, Beer-Weisel R, Dukler D, Press F, Zlotnik A et al. DIC score in pregnant women – a population based modification of the International Society on Thrombosis and Hemostasis score. *PLoS One.* 2014;9(4):e93240. DOI: 10.1371/journal.pone.0093240.
6. 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.
7. 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.
8. Mikhaleva LM, Cherniaev AL, Samsonova MV, Zayratyants OV, Kakturskiy LV, Vasyukova OA et al. Pathological features in 100 deceased patients with COVID-19 in correlation with clinical and laboratory data. *Pathol Oncol Res.* 2021;27:1609900. DOI: 10.3389/pore.2021.1609900.
9. Ho JS, Sia CH, Chan MY, Lin W, Wong RC. Coronavirus-induced myocarditis: a meta-summary of cases. *Heart Lung.* 2020;49(6):681–5. DOI: 10.1016/j.hrtlng.2020.08.013.
10. Gavrilaki E, Anyfanti P, Gavrilaki M, Lazaridis A, Douma S, Gkaliagkousi E. Endothelial dysfunction in COVID-19: lessons learned from coronaviruses. *Curr Hypertens Rep.* 2020;22(9):63. DOI: 10.1007/s11906-020-01078-6.
11. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med.* 2020;38(7):1504–7. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.04.048.
12. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерibas В.Ю., Тодоров С.С. (мл.). Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12. Todorov SS, Kazmin AS, Deribas VYu, Todorov SS (Jr.). Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19. Clinical and experimental morphology. 2022;11(2):6–12 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.
13. Ермола Ю.А., Гальшевская А.А., Давыдова А.А., Бекетов А.А., Макалиш Т.П., Кривенцов М.А. Поражение миокарда у пациентов с COVID-19: серия аутопсийных случаев. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(4):59–69. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.59-69. Yermola YuA, Galyshevskaya AA, Davydova AA, Beketov AA, Makalish TP, Kriventsov MA. Myocardial lesions in patients with COVID-19: autopsy case series. Clinical and experimental morphology. 2022;11(4):59–69 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.59-69.
14. 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. Москва: НИИОЗММ ДЗМ, 2020. Доступно по адресу: https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/ru-RU/patanomiya_covid19_fullv2_compressed.pdf. Zayratyants OV, Samsonova MV, Mikhaleva LM, Cherniaev AL, Mishnev OD, Krupnov NM et al. Pathological anatomy of COVID-19: Atlas. Moscow: NIOZMM DZM, 2020 (In Russ.). Available from: https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/ru-RU/patanomiya_covid19_fullv2_compressed.pdf.
15. Kariyanna PT, Sutarjono B, Grewal E, Singh KP, Aurora L, Smith L et al. A systematic review of COVID-19 and myocarditis. *Am J Med Case Rep.* 2020;8(9):299–305. DOI: 10.12691/ajmcr-8-9-11.

16. *Merrill JT, Erkan D, Winakur J, James JA.* Emerging evidence of a COVID-19 thrombotic syndrome has treatment implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2020;16(10):581–9. DOI: 10.1038/s41584-020-0474-5.
17. *Алексеева Л.А., Рагимов А.А.* ДВС-синдром. 2-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 96 с.
Alekseeva LA, Ragimov AA. DIC syndrome. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2020. 96 p. (In Russ.).
18. *Fox SE, Falgout L, Vander Heide RS.* COVID-19 myocarditis: quantitative analysis of the inflammatory infiltrate and a proposed mechanism. *Cardiovasc Pathol.* 2021;54:107361. DOI: 10.1016/j.carpath.2021.107361.
19. *Литвицкий П.Ф.* Клиническая патофизиология: Учебник. Москва: Практическая медицина, 2017. 885 с.
Litvitskiy PF. Clinical pathophysiology: Textbook. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2017. 885 p. (In Russ.).

Информация об авторах

Андрей Сергеевич Конторщиков – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Майя Анатольевна Кунижева – кандидат медицинских наук, врач-инфекционист отделения по лечению новой коронавирусной инфекции № 3 Университетской клинической больницы № 4 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Елена Павловна Батракова – заведующая 2-м инфекционным отделением Университетской клинической больницы № 4 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Зарема Болатовна Джафарова – врач ультразвуковой и функциональной диагностики Университетской клинической больницы № 4 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Олеся Александровна Васюкова – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Сергей Александрович Карпушов – ординатор второго года терапевтического факультета Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Валерий Викторович Варясин – кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением, врач-патологоанатом ГКБ № 52.

Эльвира Элчиновна Бережная – врач-патологоанатом ГКБ № 52.

Лев Владимирович Кактурский – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, профессор кафедры патологической анатомии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Author information

Andrey S. Kontorschikov – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-1032-0353>

Maya A. Kunizheva – Cand. Sci. (Med), Infectionist, COVID-19 department No. 3, University Clinical Hospital No. 4, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
<https://orcid.org/0000-0001-5416-0972>

Elena P. Batrakova – Head of the 2nd Infectious Diseases Department, University Clinical Hospital No. 4, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
<https://orcid.org/0000-0002-0917-1039>

Zarema B. Dzhafarova – Ultrasonographer and Functional Diagnosis Specialist, University Clinical Hospital No. 4, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
<https://orcid.org/0000-0002-7467-3318>

Olesya A. Vasyukova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-6068-7009>

Sergey A. Karpushov – 2nd-year Resident, Therapeutic Faculty, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education.
<https://orcid.org/0000-0002-8302-1135>

Valery V. Varyasin – Cand. Sci. (Med), Head of the Pathology Department, Pathologist, City Clinical Hospital No. 52.
<https://orcid.org/0000-0003-1136-6203>

Elvira E. Berezhnaya – Pathologist, City Clinical Hospital No. 52.
<https://orcid.org/0000-0003-1407-0408>

Lev V. Kakturskiy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-7896-2080>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Professor, Pathology Department, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Роль вируса папилломы человека в развитии эпителиальных опухолей молочной железы

А.В. Лагуева^{1,2}, Н.Г. Плехова¹, А.А. Цибулина¹,
Ю.И. Гаман¹, А.А. Семенова^{1,3}, В.И. Апанасевич¹

¹ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия

² ГБУЗ Приморский краевой онкологический диспансер, Владивосток, Россия

³ КГАУЗ Владивостокская клиническая больница № 2, Владивосток, Россия

Резюме. Введение. Этиологическим фактором развития гиперпластических процессов в эпителии молочной железы с формированием доброкачественной и злокачественной опухоли считают вирусную инфекцию. Вирус папилломы человека (ВПЧ) называют предполагаемой причиной развития рака молочной железы. Цель исследования – определить наличие белков Е6 и L1 ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевых тканях молочной железы при доброкачественных и злокачественных процессах.

Материалы и методы. Выполнен ретроспективный анализ историй болезни 608 пациенток, оперированных по поводу внутрипротоковой папилломы (n=304) и по поводу других доброкачественных новообразований молочной железы (n=304), на сопряженность с последующим развитием рака молочной железы. Проведено иммуногистохимическое исследование на наличие белков раннего Е6 ВПЧ типов 16, 18 и позднего L1 ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18, 31 и показателя пролиферации Ki-67 в тканях доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолей молочной железы.

Результаты. Установлено повышение риска развития рака молочной железы в 2,3 раза для пациенток с внутрипротоковой папилломой в анамнезе. Большинство образцов с позитивной реакцией на белок Е6 обнаружено в группе опухолей с наличием структур внутрипротоковой папилломы, реакция на белок L1 отмечалась примерно в равном числе образцов во всех группах доброкачественных опухолей. Определена прямая умеренная корреляция между показателями синтеза белков Ki-67 и L1 ($R=0,54$; $r=0,0057$) при внутрипротоковой папилломе, указывающая на продуктивную инфекцию и возможное участие белка L1 в пролиферации эпителия данного типа опухолей. В образцах злокачественных новообразований и при доброкачественной пролиферации установлена слабая корреляция ($R=0,47$; $r=0,0172$) между Ki-67 и показателями Е6, L1, что, вероятно, связано с отсутствием продуктивной инфекции в этих типах тканей.

Заключение. Исследование показало возможное участие белков Е6, L1 вируса папилломы человека в развитии пролиферативных процессов в молочной железе. Внутрипротоковая папиллома в анамнезе пациенток повышает риск развития рака молочной железы. Изучение синтеза белков Е6 и L1 в комплексе позволяет уточнить стадию жизненного цикла вируса папилломы человека, а сопряжение этих значений с показателем Ki-67 дает информацию о возможном риске прогрессирования доброкачественного процесса в злокачественный.

Ключевые слова: опухоль молочной железы, рак молочной железы, онковирусы, вирус папилломы человека (ВПЧ), внутрипротоковая папиллома

Для корреспонденции: Александра Викторовна Лагуева. E-mail: sandy767@mail.ru

Для цитирования: Лагуева А.В., Плехова Н.Г., Цибулина А.А., Гаман Ю.И., Семенова А.А., Апанасевич В.И. Роль вируса папилломы человека в развитии эпителиальных опухолей молочной железы. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):24–33. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.1.24-33.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовского гранта Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (№ ААА-А17-117013050044-8).

Статья поступила 24.08.2023. Получена после рецензирования 06.09.2023. Принята в печать 20.11.2023.

The role of human papillomavirus in the epithelial breast tumor formation

A.V. Lagureva^{1,2}, N.G. Plekhova¹, A.A. Tsiulina¹, Yu.I. Gaman¹, A.A. Semenova^{1,3}, V.I. Apanasevich¹

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

² Primorsky Regional Oncological Center, Vladivostok, Russia

³ Vladivostok Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russia

Abstract. Introduction. Viral infection is considered an etiological factor for the development of hyperplastic processes in the breast epithelium leading to the formation of benign and malignant tumors. Human papillomavirus (HPV) is suspected to cause breast cancer. The aim of the study was to determine the presence of proteins E6 and L1 in breast tumor tissues in benign and malignant lesions, since they are considered to be highly oncogenic in HPV.

Materials and methods. We conducted a retrospective analysis of 608 medical records of patients operated on intraductal papilloma (n=304) and other benign breast tumors to determine their association with subsequent breast cancer development. An immunohistochemical study was carried out to determine the presence of proteins of early E6 HPV types 16 and 18; late L1 HPV types 1, 6, 11, 16, 18, and 31; and the proliferation Ki-67 in the tissues of benign and malignant epithelial breast tumors.

Results. The patients with a history of intraductal papilloma were found to have a 2.3-fold increased risk of developing breast cancer. The majority of samples with a positive reaction to the E6 protein were detected in the group of tumors with the intraductal papilloma structures; the reaction to L1 protein was observed in approximately equal numbers of samples in all groups of benign tumors. A direct moderate correlation was determined between the parameters of protein synthesis Ki-67 and L1 ($R=0.54$; $p=0.0057$) in intraductal papilloma, indicating a productive infection and possible participation of the L1 protein in the epithelial proliferation of benign tumors. In cancer samples and benign proliferation, we determined a weak correlation ($R=0.47$; $p=0.0172$) between Ki-67 and E6 and L1 parameters, which is likely to be explained by the absence of productive infection in both benign and malignant tumors of the breast.

Conclusion. The study showed possible participation of HPV proteins E6 and L1 in the development of proliferative processes in the breast. A history of intraductal papilloma increases the risk of developing breast cancer. Studying the synthesis of proteins E6 and L1 combined makes it possible to determine the stage of the life cycle of HPV. Pairing these values with the Ki-67 index provides information about possible risks of a benign lesion development into a malignant one.

Keywords: breast tumor, breast cancer, oncoviruses, human papillomavirus (HPV), intraductal papilloma

Corresponding author: Alexandra V. Lagureva. E-mail: sandy767@mail.ru

For citation: Lagureva A.V., Plekhova N.G., Tsiulina A.A., Gaman Y.T., Semenova A.A., Apanasevich V.I. The role of human papillomavirus in the epithelial breast tumor formation. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):24–33 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.24-33

Funding. The study was supported with the internal university grant of the Pacific State Medical University (No. AAA-A17-117013050044-8).

Received 24.08.2023. **Received in revised form** 06.09.2023. **Accepted** 20.11.2023.

Введение

При злокачественных новообразованиях (ЗНО) молочной железы поражаются эпителиальные клетки протоков или долек [1, 2]. Согласно клиническим рекомендациям «Рак молочной железы» (2021), среди пролиферативных образований молочной железы выделяют доброкачественные эпителиальные пролиферации, папиллярные опухоли, неинвазивные и инвазивные карциномы. Проллиферативные поражения, в особенности атипическая протоковая гиперплазия, повышают риск развития ЗНО примерно на 1% в течение каждого года после постановки диагноза [3]. Такой тип поражения обнаруживают при фибroadеномах, фибroadеноматозах с наличием внутрипротоковых папиллом и склерозирующих аденозах, где пролиферация затрагивает

эпителиальные и миоэпителиальные клетки. Считаясь доброкачественным поражением, атипическая гиперплазия тем не менее рассматривается как заболевание, склонное к рецидивам и имеющее повышенный риск малигнизации [4].

Дисгормональные нарушения считаются причинами развития гиперпластических процессов в молочной железе, до 44% биопсий имеет положительный рецепторный статус к эстрогенам. В качестве триггеров малигнизации клеток также рассматривают онкогенные вирусы, тропные эпителиальным клеткам, – вирусы папилломы человека (ВПЧ) [5]. Установлено более 200 генотипов ВПЧ, сопровождающих развитие доброкачественных и злокачественных поражений. Доказано, что ВПЧ высокого

онкогенного риска типов 16, 18 и 31 инициируют развитие рака шейки матки, исследованы молекулярные механизмы трансформации белка p53 с участием вирусных белков E6/E7 в клетках этой опухоли [6, 7]. Приведены сведения, что в 86% случаев рака молочной железы (РМЖ) в опухолевой ткани определяется ДНК ВПЧ, в доброкачественных поражениях – до 74%, в нормальных тканях молочной железы – до 30% [1, 2]. При РМЖ определены типы ВПЧ (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 и 52), из которых чаще встречается тип 16 (от 13 до 66% случаев) и тип 18 (от 20 до 55% случаев) [8, 9]. Показано, что белки E6/E7 ВПЧ выявлены в ткани опухоли у пациенток с РМЖ в 24–76% наблюдений, и приведены доказательства участия этих белков в малигнизации клеток на модели *in vitro*, что указывает на функциональную значимость вируса в развитии опухоли [10]. Так, белки E6/E7 усиливают клеточную пролиферацию, нарушая регуляцию генов *BRCA-1*, *TP53* и активность рецепторов к эпидермальному фактору роста 2-го типа HER2 [11]. Показано, что у пациенток выявлялся одинаковый тип ВПЧ как при доброкачественном опухолевом процессе, так и при последующем РМЖ [12]. Таким образом, ВПЧ вполне оправданно может рассматриваться в качестве этиологического фактора, вызывающего пролиферацию эпителия молочной железы и последующее развитие доброкачественной или злокачественной опухоли. С учетом изложенного выше целью нашего исследования стало определение наличия белков E6 и L1 ВПЧ в опухолевых тканях молочной железы.

Материалы и методы

Выполнен анализ сопряженности наличия внутрипротоковой папилломы молочной железы в анамнезе и развившегося впоследствии РМЖ у 608 пациенток (возраст от 22 до 82 лет) с пролиферативным поражением молочных желез, обратившихся в маммологический центр Владивостока в период с 2014 по 2022 год. В группу наблюдения были включены 304 истории болезни пациенток, имевших в анамнезе операцию по удалению внутрипротоковой папилломы, группу сравнения составили 304 истории болезни без подобного анамнеза. Образцы для исследования были деидентифицированы, согласие пациенток не требовалось. Исследование одобрено этическим комитетом Тихоокеанского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 16.11.2020).

Проведено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование 134 образцов доброкачественных опухолей молочных желез, полученных у пациенток ООО «Инномед-Плюс» при хирургическом удалении, и 95 образцов тканей злокачественных эпителиальных опухолей, выбранных из архива Приморского краевого онкологического диспансера (Владивосток). Кусочки биопсий фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали по стандартной методике в спиртовых

растворах возрастающей концентрации и ксилоле, заливку в парафин проводили с использованием заливочной станции Leica EG1150H (Leica Biosystems, Германия). Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2245 (Leica Biosystems, Германия) готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, гистологический тип опухоли молочных желез устанавливали согласно международной гистологической классификации ВОЗ (2019). Образцы были разделены на три группы: доброкачественная пролиферация эпителия (n=54), внутрипротоковая папиллома (n=80), ЗНО (n=95). В качестве контроля были использованы образцы здоровой ткани молочных желез, прилегающей к доброкачественным опухолям (n=36).

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием поликлональных антител мыши против белка E6 ВПЧ типов 16, 18 (1:100, клон PA5-12038, Invitrogen, США), моноклональных антител мыши против капсидного белка L1 ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18, 31 (1:30, BPV-1/1H8 + CAMVIR, Abcam, США), маркера пролиферации Ki-67 (1:20; клон MIB-1, изотип IgG1, Dako, Дания). Положительным контролем служили образцы тканей рака шейки матки человека, позитивные на ВПЧ типов 16, 18, негативным – образцы исследуемой ткани без нанесения первичных антител. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Olympus CX41, оснащенного цифровой камерой U-TV0.35XC-2 (Olympus, Япония).

Морфометрический анализ проводили, применяя программу NIS-Elements BR (Nikon, Япония) и оценивая количество продуктов ИГХ реакции по 10 изображениям при 200-кратном увеличении. Пороговые значения настраивали по областям высокой оптической плотности и контрастности с формированием бинара. Для каждого образца проводилось измерение бинаров, высчитывалось среднее значение интенсивности позитивного окрашивания, количества, площади и периметра бинаров, результат выражали в пикселях.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12 (StatSoft, Inc., США) и Microsoft Excel (Microsoft Office 2016). Для проверки нормальности распределения использовали критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Данные измерений с нормальным распределением представляли как значение среднего и стандартного отклонения ($m \pm SD$), в случаях несоответствия нормальному – как значение медианы (Me) и квартилей (Q1; Q3). Достоверность различий при сравнении двух групп независимых данных при нормальном распределении оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, в иных случаях использовали непараметрический H-критерий Краскела–Уоллиса. Коэффициент корреляции Пирсона применяли для оценки линейной зависимости между показателями. Показатели считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Когортное ретроспективное исследование включало данные историй болезни 608 пациенток из базы канцер-регистра Приморского краевого онкологического диспансера, у которых были выявлены ЗНО различных локализаций, в том числе РМЖ [13]. Установлено, что в группе наблюдения у семи из 304 пациенток (2,3%) с внутрипротоковой папилломой в анамнезе впоследствии развился РМЖ. В группе сравнения у трех из 304 пациенток (1,0%) впоследствии зарегистрировали РМЖ. Выявлены ЗНО других локализаций у шести из 304 пациенток (2,0%) в каждой группе. Общее количество ЗНО в группе наблюдения составило 13 случаев из 304 (4,3%) и девять из 304 (3,0%) в сравнительной группе пациенток. Таким образом, определено повышение риска развития РМЖ в 2,3 раза для пациенток с внутрипротоковой папилломой молочных желез в анамнезе.

Синтез онкобелка Е6 внутри клетки-мишени осуществляется на ранней стадии жизненного цикла вируса, нарушает функционирование белка апоптоза p53, что приводит к трансформации клетки. Капсидный белок L1 синтезируется в созревающих клетках эпителия на последней стадии развития вириона. Обнаружение белка L1 в клетках свидетельствует о продуктивной фазе вирусной инфекции с образованием эписомы. Экспрессия белка пролиферативной активности Ki-67 является клинически значимой величиной для определения молекулярного подтипа опухоли, а также сильным прогностическим фактором эффективности лечения РМЖ [14].

Позитивная реакция на белки Е6, L1 обнаруживалась в цитоплазме и ядрах клеток эпителия молочной железы (рис. 1). При доброкачественной пролиферации эпителия в тканях молочной железы белок Е6 отмечался в 56% образцов (30 из 54) (рис. 1 А), белок L1 – в 41% образцов (22 из 54) (рис. 1 В). При внутрипротоковой папилломе позитивная реакция на белок Е6 отмечена в 70% случаев (56 из 80) (рис. 1 С), на L1 – в 44% образцов (35 из 80) (рис. 1 D). Наличие белков Е6 и L1 в одних и тех же образцах обнаруживалось в 40% случаев (32 из 80). В 21% случаев ЗНО (20 из 95) мы наблюдали позитивную реакцию различной интенсивности на белок Е6 и в 33% образцов (31 из 95) – на белок L1 (рис. 1 Е, F). Одновременное наличие Е6 и L1 зарегистрировано в 19% случаев ЗНО (18 из 95). В контрольных образцах отмечено 25% случаев (девять из 36) положительных реакций на белок Е6, и 28% (10 из 36) на белок L1. Таким образом, наибольшее количество образцов с позитивной реакцией на белок Е6 (70%) обнаружено в тканях молочной железы с наличием структур внутрипротоковой папилломы. Позитивная реакция на белок L1 регистрировалась во всех группах доброкачественных опухолей примерно одинаково – 41% в группе с доброкачественной пролиферацией и 44% с внутрипротоковой папилломой. Необходимо отметить, что количество Е6- и L1-позитивных образ-

цов в группе ЗНО и в контрольной группе определялось приблизительно в равном количестве.

Проведен морфометрический анализ интенсивности ИГХ реакции, алгоритм которого представлен на рисунках 2 А, В. Установлены количественные показатели выявления белка в образцах с внутрипротоковой папилломой, которые составили для белка Е6 122,53 пикселя (82,91; 182,81), для L1 – 86,79 (57,59; 125,80). При доброкачественной пролиферации эпителия значения были равны 102,11 пикселя (72,05; 123,13) и 78,90 (65,22; 104,32), при ЗНО – 86,55 (72,93; 105,47) и 60,16 (44,26; 75,32), соответственно (рис. 3 А, В). В реальной практике количественную оценку интенсивности ИГХ реакции с привлечением морфометрического анализа проводят редко, обычно используют визуальный метод определения интенсивности реакции либо подсчитывают количество окрашенных клеток в процентах. Подобный метод субъективен, и зачастую данные расходятся при повторных оценках экспрессии маркеров. Мы разработали собственную шкалу референсных значений для установки соответствия между качественными и количественными морфометрическими показателями. Так, в качестве отрицательной реакции (–) было принято значение до 49 пикселей, слабая положительная реакция (+) составила от 50 до 65 пикселей, умеренная положительная (++) от 66 до 150 пикселей и сильная положительная (+++) от 151 пикселя и выше. С учетом принятых референсных значений определяли степень интенсивности ИГХ реакции белков в эксперименте (табл.).

Наибольший размах значений и максимальную интенсивность реакции на белки Е6 и L1 ВПЧ показали образцы с внутрипротоковой папилломой, что подтверждает мнение о данном поражении как о склонном к прогрессированию и малигнизации. Показатели интенсивности реакции на белки Е6 и L1 в образцах доброкачественных пролиферативных опухолей и при внутрипротоковой папилломе не имели существенных различий, однако размах крайних значений был меньше. Образцы ЗНО показали умеренную интенсивность синтеза белков, а количественные значения интенсивности реакции на белок L1 статистически не различались с показателями контрольной группы. Необходимо отметить, что количественные показатели интенсивности часто перекрываются между группами, не позволяя четко разграничить их соответственно гистологическому типу опухоли.

Определяли связь между наличием в тканях вирусных белков и маркером пролиферации Ki-67. Производился подсчет не менее 500 клеток в трех полях зрения при увеличении объектива $\times 40$, индекс Ki-67 определялся как отношение среднего количества положительно окрашенных клеток к общему количеству клеток. В образцах с доброкачественной пролиферацией определялись низкие значения индекса Ki-67, от 0 до 5%, что соответствует уровню пролиферации клеток нормальных тканей. Индекс Ki-67 в образцах

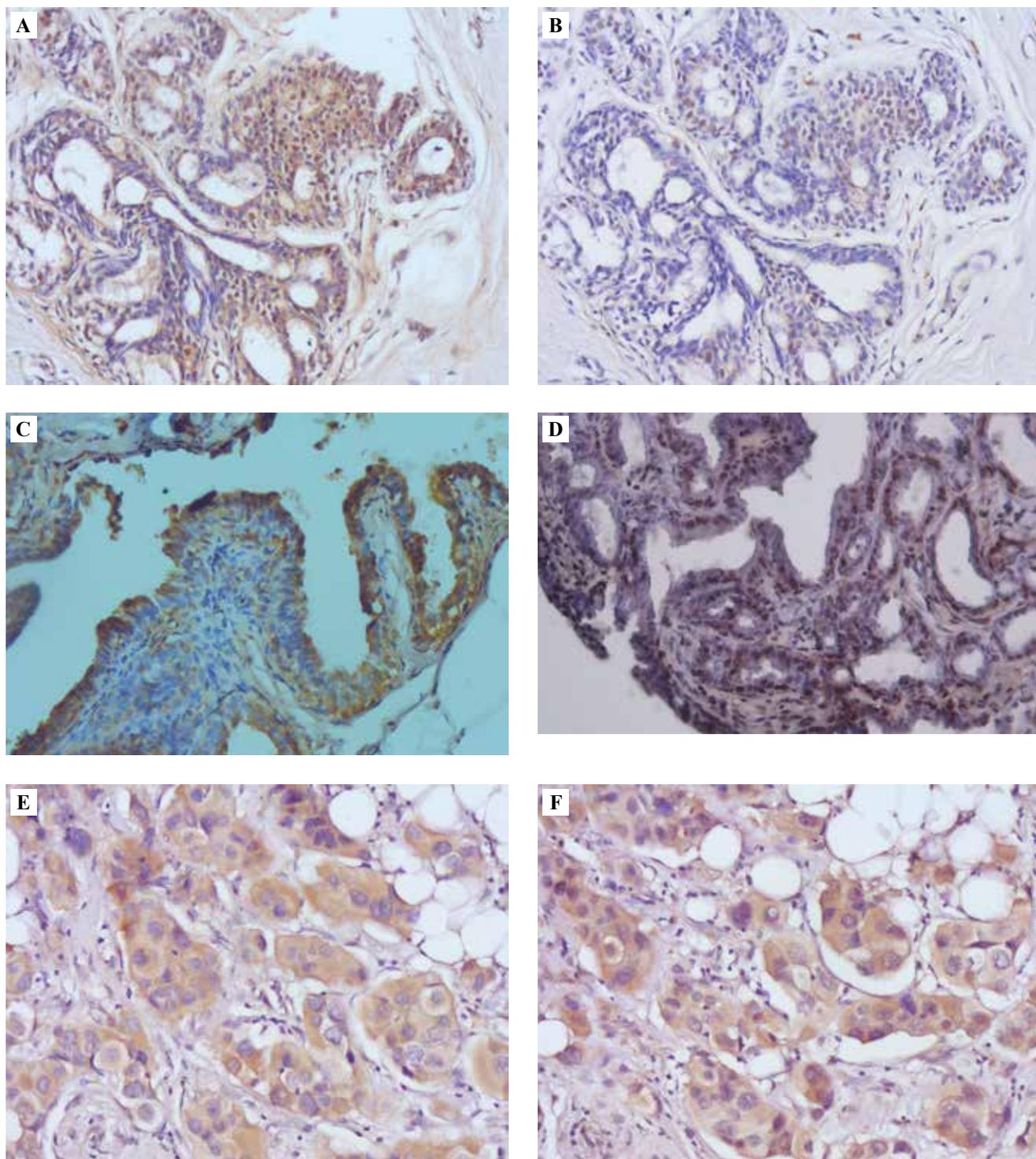


Рис. 1. Позитивная реакция на наличие белков ВПЧ Е6 (А, С, Е) и L1 (В, D, F) в клетках протоков молочной железы. А, В – доброкачественная пролиферация эпителия, С, D – внутрипротоковая папиллома, Е, F – рак молочной железы. ИГХ окрашивание, $\times 200$

Fig. 1. Positive reaction to the presence of HPV E6 (A, C, E) and L1 (B, D, F) in the cells of breast ducts. A, B – benign epithelial proliferation, C, D – intraductal papilloma, E, F – breast cancer. IHC stain, $\times 200$

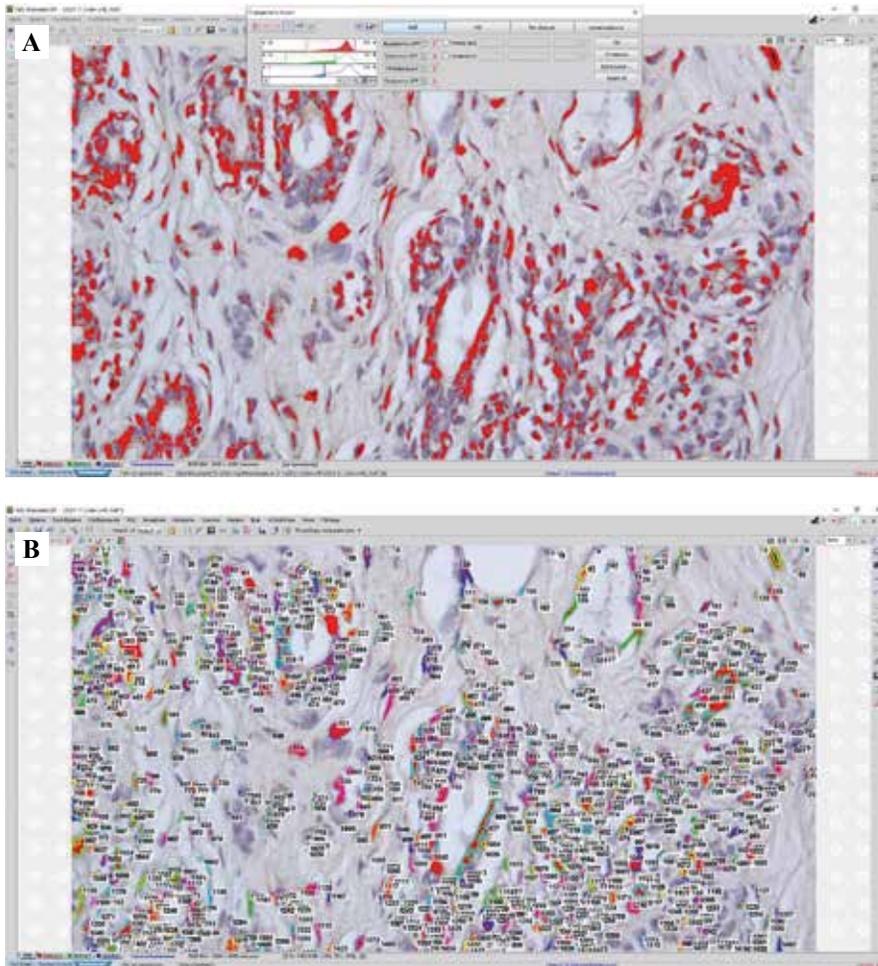


Рис. 2. Алгоритм морфометрического анализа степени интенсивности ИГХ окрашивания. А – выделение бинарной площади ROI по цветовым характеристикам, В – измерение выделенных бинаров

Fig. 2. The algorithm of morphometric analysis of IHC stain intensity degree. А – allocation of the binary area of the ROI by color characteristics, В – binary image: measurement of the selected intensity values

Таблица | Table

**Качественная и количественная характеристика наличия белков Е6 и L1 ВПЧ в тканях молочной железы |
Qualitative and quantitative characteristics of HPV proteins E6 and L1 in the breast tissue**

Гистологический тип опухоли Tumor histology	Показатели интенсивности и качественные характеристики позитивной реакции Intensity indicators and qualitative characteristics of a positive reaction	
	белок Е6 ВПЧ типа 16,18 HPV E6 protein 16 and 18	капсидный белок L1 ВПЧ типа 1, 6, 11, 16, 18, 31 HPV capsid protein L1 1, 6, 11, 16, 18, and 31
Ткань, прилегающая к опухоли Tissue adjacent to the tumor	50,47 (35,33; 74,52) положительная от слабой до умеренной (+/++) positive from mild to moderate (+/++)	46,14 (37,12; 64,54) от отрицательной до слабой положительной (-/+) from negative to weak positive (-/+)
Доброкачественная пролиферация эпителия Benign epithelial proliferation	102,11 (72,05; 123,13)* положительная умеренная (++) positive moderate (++)	78,90 (65,22; 104,32)* положительная умеренная (++) positive moderate (++)
Внутрипротоковая папиллома Intraductal papilloma	122,53 (82,91; 182,81)* положительная, от умеренной до сильной (++) positive, moderate to strong (++)	86,79 (57,89; 127,54)* положительная умеренная (++) positive moderate (++)
Рак молочной железы Breast cancer	86,55 (72,93; 105,47)* положительная умеренная (++) positive moderate (++)	60,16 (44,26; 75,32) от отрицательной до слабой положительной (-/+) from negative to weak positive (-/+)

*различия между показателями контрольных и патологических образцов достоверны при $p < 0,05$

*differences between the indicators of control and pathological samples are significant at $p < 0.05$

ЗНО имел различные значения в соответствии с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Количественные показатели интенсивности реакции на белок Ki-67 составили в пикселях 37,10 (13,10; 55,53) в образцах с доброкачественной пролиферацией, 10,17 (7,59; 24,91) в образцах с внутрипротоковой папилломой и 56,01 (23,85; 148,85) в образцах ЗНО (рис. 3 С). Обнаружена слабая корреляция между показателями E6, L1 и маркером Ki-67 при доброкачественной пролиферации и ЗНО ($R=0,47$; $p=0,0172$), указывающая на отсутствие продуктивной инфекции. При внутрипротоковой папилломе отмечена прямая умеренная корреляция ($R=0,54$; $p=0,0057$) между Ki-67 и L1, свидетельствующая о возможном участии белка L1 в пролиферации эпителия, а также о нахождении вируса в форме капсида.

Обсуждение

Внутрипротоковая папиллома относится к поражению, имеющему повышенный риск развития ЗНО, и характеризуется частым бессимптомным течением [15, 16]. Нами установлено повышение риска

развития РМЖ в 2,3 раза у пациенток с наличием в анамнезе внутрипротоковой папилломы. Развившиеся впоследствии у этих пациенток злокачественные новообразования других локализаций были выявлены в одинаковом количестве с группой сравнения. В качестве этиологической причины пролиферативных изменений эпителия молочных желез указывается ВПЧ, который определяется в образцах доброкачественных (до 74%) и злокачественных (до 84%) опухолей молочных желез. Тем не менее приведенные разными авторами данные по распространенности вирусного поражения молочной железы существенно разнятся, что связано с рядом причин: различные методические подходы к выявлению ДНК в опухолевых тканях, их состояние (замороженные или залитые в парафин), малое количество инфицированных клеток и многообразие возможных типов ВПЧ [1, 2, 9–12, 17]. Показано, что белки ВПЧ обнаруживаются в 72% ядер клеток при доброкачественных опухолях и в 62,5% при последующем РМЖ у тех же пациенток [18]. Позитивная реакция на белки E6 (до 70%) и L1 (до 44%) в нашем исследовании отмечена преимущественно в образцах

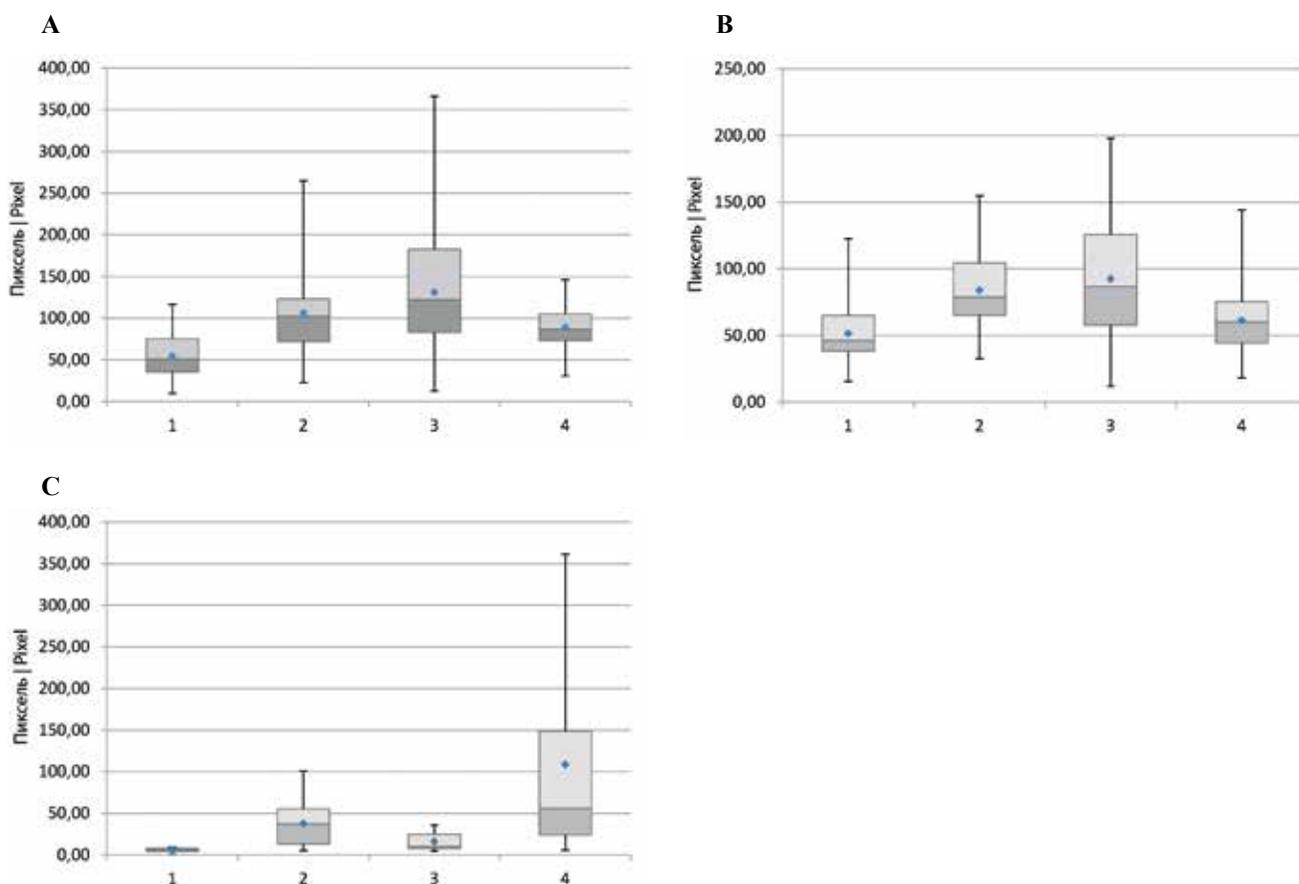


Рис. 3. Показатели интенсивности ИГХ окрашивания на наличие белков в клетках эпителия молочной железы: А – вирусных антигенов E6, В – капсидного белка L1, С – ядерного белка пролиферации Ki-67. 1 – ткань, прилежащая к опухоли, 2 – доброкачественная пролиферация эпителия, 3 – внутрипротоковая папиллома; 4 – рак молочной железы

Fig. 3. Intensity indicators of the IHC staining of protein presence in the cells of the breast: А – viral antigens E6, В – capsid protein L1, С – nuclear proliferation protein Ki-67. 1 – tissue adjacent to the tumor, 2 – benign epithelial proliferation, 3 – intraductal papilloma. 4 – breast cancer

с внутрипротоковой папилломой. При доброкачественных пролиферативных процессах их количество определялось как 56% и 41%, соответственно, а при ЗНО – 21% и 33%, что было сравнимо с показателями группы контроля. В образцах с доброкачественной пролиферацией отмечалась умеренная интенсивность позитивной реакции (++) на вирусные белки E6 и L1, а совместное наличие этих белков в клетках указывало на присутствие в них вирусов одновременно в интегрированной и эписомальной форме. На наш взгляд, широкий разброс крайних значений экспрессии белков E6 и L1 в группе контроля (от отрицательной до умеренной положительной реакции) свидетельствует о возможном влиянии вируса и на эпителий опухоли, и на прилегающие к ней клетки нормальных тканей. Такой вывод соответствует данным литературы, где авторы указывают на 22% распространенность белка E6 в нормальных тканях молочной железы [1, 2]. В нашем эксперименте показатели интенсивности синтеза белков в тканях контрольной группы составили 25% и 28% для E6 и L1, соответственно.

Низкая распространенность онкобелков (21% для E6 и 33% для L1) и невысокие показатели интенсивности их синтеза (86,55 и 60,16 пикселя) в клетках РМЖ также соотносятся с данными литературы. Известно о распространенности белка E6 при РМЖ от 24 до 74%, при доброкачественных опухолях – до 72%. Опубликована информация о массивном параллельном NGS секвенировании 855 биопсий молочных желез, где обнаружены последовательности ДНК ВПЧ, соответствующие атласу генома рака TCGA (The Cancer Genome Atlas) [12]. Таким образом, методом сравнения фрагментированных последовательностей генов была доказана распространенность ВПЧ-позитивного РМЖ около 2,3%. Означает ли это, что случаи выявления белков ВПЧ в тканях РМЖ случайны или наличие вируса свидетельствует о сопутствующей инфекции при данной патологии? Для ответа на этот вопрос необходимы более массовые исследования. Установленное нами наличие белков E6 и L1 в клетках эпителиальных опухолей молочных желез указывает на некоторое участие вируса папилломы человека в развитии патологических процессов. Мы считаем, что комплексное изучение синтеза белков ВПЧ (раннего E6 и позднего L1) в клетках опухоли позволит установить стадию жизненного цикла вируса, а сопряжение этих значений с показателем пролиферации Ki-67 сможет дать информацию о возможном риске прогрессирования доброкачественного процесса в злокачественный. Учитывая тот факт, что в структуре онкологической смертности ЗНО молочной железы находятся на первом месте (16,2% от общего числа по данным за 2018 год [19]), такая информация заставит женщин задуматься о необходимости регулярного прохождения скрининга молочных желез, что, в свою очередь, позволит снизить число выявляемых запущенных случаев РМЖ. Мы предлагаем внедрить морфометрический метод

определения количественных показателей ИГХ исследования для исключения субъективности оценки интенсивности синтеза этих белков.

Заключение

Установлен повышенный риск развития рака молочной железы (в 2,3 раза) у пациенток с внутрипротоковой папилломой молочных желез в анамнезе. Наличие позитивной иммуногистохимической реакции на белки E6 и L1 вируса папилломы человека в образцах доброкачественных и злокачественных опухолей молочных желез указывает на его возможное участие в пролиферации эпителия. Наибольшая встречаемость и максимальная интенсивность синтеза белков вируса папилломы человека обнаруживались нами в тканях молочных желез с наличием структур внутрипротоковой папилломы, что косвенно свидетельствует о повышенном риске прогрессирования и высокой вероятности последующего развития инфильтративного процесса в опухолях этого типа. Результаты исследования указывают на необходимость дальнейших разработок в данном направлении и продолжения изучения роли подтипов вируса папилломы человека в развитии пролиферативных процессов в молочной железе. Возможность вакцинации против папилломавирусной инфекции может занять важное место в первичной профилактике рака молочной железы, если найдутся убедительные доказательства иницирующей роли вируса в развитии и прогрессировании данного заболевания.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Лагурева, Н.Г. Плехова, В.И. Апанасевич.

Сбор и обработка материала – А.В. Лагурева, А.А. Цибулина, А.А. Семенова, Ю.И. Гаман.

Написание текста – А.В. Лагурева, Н.Г. Плехова.

Редактирование – А.В. Лагурева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Lagureva, N.G. Plekhova, V.I. Apanasevich.

Collected the data and performed the analysis – A.V. Lagureva, A.A. Tsibulina, A.A. Semenova, Yu.I. Gaman.

Wrote the paper – A.V. Lagureva, N.G. Plekhova.

Edited the manuscript – A.V. Lagureva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Salman NA, Davies G, Majidy F, Shakir F, Akinrinade H, Perumal D et al.* Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Sci Rep.* 2017;7:43591. DOI: 10.1038/srep43591.
2. *Лагурева А.В., Плехова Н.Г., Апанасевич В.И.* Оценка роли вирусов папилломы человека и Эпштейна–Барр в развитии эпителиальных опухолей молочной железы. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(1):5–14. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.

- Lagureva AV, Plekhova NG, Apanasevich VI.* Role of human papilloma virus and Epstein-Barr virus in the development of epithelial breast tumors. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):5–14 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.
3. *Высоцкая И.В., Летагин В.П.* Атипичные гиперплазии молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2015;11(4):10–17. DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-4-10-17. *Ysotskaya IV, Letyagin VP.* Atypical hyperplasias of the breast. Tumors of female reproductive system. 2015;11(4):10–17 (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-4-10-17.
 4. *Kulka J, Madaras L, Floris G, Lax SF.* Papillary lesions of the breast. *Virchows Arch.* 2022;480(1):65–84. DOI: 10.1007/s00428-021-03182-7.
 5. *Krump NA, You J.* Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(11):684–98. DOI: 10.1038/s41579-018-0064-6.
 6. *Onyango CG, Ogonda L, Guyah B, Shiluli C, Ganda G, Orang'o OE et al.* Novel biomarkers with promising benefits for diagnosis of cervical neoplasia: a systematic review. *Infect Agents Cancer.* 2020;15(1):68. DOI: 10.1186/s13027-020-00335-2.
 7. *Altamura G, Power K, Martano M, Degli Uberti B, Galiero G, De Luca G et al.* Feliscatus papillomavirus type-2 E6 binds to E6AP, promotes E6AP/p53 binding and enhances p53 proteasomal degradation. *Sci Rep.* 2018;8(1):17529. DOI: 10.1038/s41598-018-35723-7.
 8. *Boufelli G, Giannotti MA, Ruiz CA, Barros N, Chala LF, Maesaka JY et al.* Papillomas of the breast: factors associated with underestimation. *Eur J Cancer Prev.* 2018;27(4):310–4. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000343.
 9. *Figuerola JD, Gierach GL, Duggan MA, Fan S, Pfeiffer RM, Wang Y et al.* Risk factors for breast cancer development by tumor characteristics among women with benign breast disease. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):34. DOI: 10.1186/s13058-021-01410-1.
 10. *Elagali AM, Suliman AA, Altayeb M, Dannoun AI, Parine NR, Sakr HI et al.* Human papillomavirus, gene mutation and estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J.* 2021;38:43. DOI: 10.11604/pamj.2021.38.43.22013.
 11. *Islam MS, Chakraborty B, Panda CK.* Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. *Ann Transl Med.* 2020;8(10):650. DOI: 10.21037/atm-19-2756.
 12. *Lawson JS, Glenn WK, Salyakina D, Delprado W, Clay R, Antonsson A et al.* Human papilloma viruses and breast cancer. *Front Oncol.* 2015;5:277. DOI: 10.3389/fonc.2015.00277.
 13. *Гаман Ю.И., Апанасевич В.И., Лагурева А.В., Загруднинова О.М., Плехова Н.Г., Аргисhev О.А. и др.* Рак молочной железы, ассоциированный с внутривидовым папилломатозом. Опухоли женской репродуктивной системы. 2023;19(3):25–29. DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-3-25-29.
 14. *Тележникова И.М., Жукова Л.Г., Кометова В.В., Хомерики С.Г., Карнаухов Н.С., Хатькова Е.И. и др.* Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(2):36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
 15. *Telezhnikova IM, Zhukova LG, Kometova VV, Khomeriki SG, Karnaukhov NS, Khatkova EI et al.* Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer using the global scoring. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(2):36–43 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
 16. *Li X, Wang H, Sun Z, Fan C, Jin F, Mao X.* A retrospective observational study of intraductal breast papilloma and its coexisting lesions: a real-world experience. *Cancer Med.* 2020;9(20):7751–62. DOI: 10.1002/cam4.3308.
 17. *de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE.* Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):R1–11. DOI: 10.1186/bcr940.
 18. *Maldonado-Rodríguez E, Hernández-Barrales M, Reyes-López A, Godina-González S, Gallegos-Flores PI, Esparza-Ibarra EL et al.* Presence of human papillomavirus DNA in malignant neoplasia and non-malignant breast disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(8):3648–65. DOI: 10.3390/cimb44080250.
 19. *Ngan C, Lawson JS, Clay R, Delprado W, Whitaker NJ, Glenn WK.* Early Human papilloma virus (HPV) oncogenic influences in breast cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9:93–97. DOI: 10.4137/BCBCR.S35692.
 20. *Будаев Б.С., Банзарова Л.П., Богданова О.Г., Тармаева И.Ю.* Анализ смертности населения от злокачественных новообразований на региональном уровне. Тихоокеанский медицинский журнал. 2021;(3):71–76. DOI: 10.34215/1609-1175-2021-3-71-76.
 21. *Budaev BS, Banzarova LP, Bogdanova OG, Tarmaeva IYu.* Analysis of malignant neoplasms mortality rate of the population at the regional level. *Pacific Medical Journal.* 2021;(3):71–76 (In Russ.). DOI: 10.34215/1609-1175-2021-3-71-76.

Информация об авторах

Александра Викторовна Лагурева – врач клинко-диагностической лаборатории Приморского краевого онкологического диспансера, аспирантка центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Наталья Геннадьевна Плехова – доктор биологических наук, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Анастасия Андреевна Цибулина – врач клинко-диагностической лаборатории Приморского краевого онкологического диспансера, лаборантка центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Юлия Ивановна Гаман – студентка 6-го курса лечебного факультета Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Алина Александровна Семенова – врач клинико-диагностической лаборатории Владивостокской клинической больницы № 2, лаборантка Центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.
Владимир Иосифович Апанасевич – доктор медицинских наук, профессор института хирургии Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Authors information

Alexandra V. Lagureva – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Primorsky Regional Oncological Center; Postgraduate Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-4195-9184>

Natalia G. Plekhova – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>

Anastasia A. Tsubulina – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Primorsky Regional Oncological Center; Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0003-2052-9569>

Yulia I. Gaman – 6th-year Student, Faculty of Medicine, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0006-1163-2953>

Alina A. Semenova – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Vladivostok Clinical Hospital No. 2; Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0009-0007-2221-4543>

Vladimir I. Apanasevich – Dr. Sci. (Med.), Professor, Institute of Surgery, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-0808-5283>

Динамика гиперхромных и MyoD-позитивных ядер регенерирующих скелетных мышц при инфракрасной фотомодуляции

Р.В. Тахавиев, Г.В. Брюхин, Е.С. Головнева

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

Резюме. Введение. В настоящее время не существует методик, позволяющих в полной мере восстановить скелетную мышечную ткань после травмы. Инфракрасное лазерное воздействие является универсальным физиотерапевтическим фактором, используемым с целью активации пролиферации, увеличения активности ферментов, уменьшения воспаления и отека. При этом не изучено влияние времени экспозиции инфракрасного лазерного облучения на активацию миосателлитцитов. Целью исследования являлся анализ влияния длительности инфракрасного лазерного облучения на состояние клеток камбиального резерва в регенерирующей скелетной мышечной ткани.

Материалы и методы. В эксперименте (128 самцов крыс Вистар) были сформированы четыре группы: 0 – интактный контроль; I (динамический контроль) – резаная рана *m. gastrocnemius*; II – лазерное облучение раны с экспозицией 60 секунд; III – лазерное облучение раны с экспозицией 180 секунд. Лазер применялся в непрерывном режиме, мощность 1,0 Вт. Проведено морфологическое исследование площади гиперхромных мышечных ядер и плотности расположения MyoD⁺ ядер на разных сроках эксперимента.

Результаты. В группе применения инфракрасного лазерного облучения с экспозицией 180 секунд площадь гиперхромных ядер в 1-е сутки снижалась, а на 7-е сутки была на 30% больше, чем в динамическом контроле. Плотность расположения MyoD⁺ ядер в группах с применением лазера увеличивалась по сравнению с динамическим контролем на сроке 3 суток вне зависимости от времени экспозиции, однако на 7-е сутки количество ядер было выше в группе с экспозицией 60 секунд.

Заключение. После применения инфракрасного лазера с экспозицией 60 секунд преимущественно повышается плотность расположения MyoD⁺ ядер, лазерное воздействие 180 секунд сильнее влияет на прирост площади гиперхромных ядер мышечной ткани.

Ключевые слова: скелетная мышечная ткань, регенерация, инфракрасный лазер, гиперхромные ядра, MyoD

Для корреспонденции: Ростислав Винерович Тахавиев. E-mail: rkenpachi@bk.ru

Для цитирования: Тахавиев Р.В., Брюхин Г.В., Головнева Е.С. Динамика гиперхромных и MyoD-позитивных ядер регенерирующих скелетных мышц при инфракрасной фотомодуляции. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):34–41. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.34-41.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 10.05.2023. Получена после рецензирования 24.05.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Dynamics of hyperchromic and MyoD-positive nuclei of regenerating skeletal muscles during infrared photomodulation

R. V. Takhaviev, G. V. Bryukhin, E. S. Golovneva

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Abstract. Introduction. Currently, there are no techniques that allow to fully restore skeletal muscle tissue after injury. Infrared laser exposure is a universal physiotherapeutic method used to activate proliferation, increase enzyme activity, and reduce inflammation and edema. At the same time, the influence of the exposure time of infrared laser irradiation on the activation of myosatellite cells has been poorly studied. The paper aimed to analyze the effect of the duration of infrared laser irradiation on the state of cambial reserve cells in regenerating skeletal muscle tissue.

Materials and methods. In the experiment (128 male Wistar rats), 4 groups were formed: 0 – intact group; I (dynamic control) – incised wound *m. gastrocnemius*; II – laser irradiation of the wound with a 60-second

exposure; and III – laser irradiation of the wound with a 180-second exposure. The laser was used in a continuous mode, the power being 1.0 W. We performed a morphological study of the area of hyperchromatic muscle nuclei and the density of MyoD⁺ nuclei at different periods of the experiment.

Results. In group III, the area of hyperchromatic nuclei decreased on day 1, and on day 7, it was 30% more than in group I. The density of the arrangement of MyoD⁺ nuclei in groups II and III increased compared to that in group I for a period of 3 days, regardless of the exposure time. However, on day 7, the number of nuclei was greater in group II.

Conclusion. After the use of an infrared laser with a 60-second exposure, the density of MyoD⁺ nuclei increases, whereas the effect of a 180-second laser exposure has a more dramatic effect on the increase in the area of hyperchromic nuclei of muscle tissue.

Keywords: skeletal muscle tissue, regeneration, infrared laser, hyperchromic nuclei, MyoD

Corresponding author: Rostislav V. Takhaviev. E-mail: rkenpachi@bk.ru

For citation: Takhaviev R.V., Bryukhin G.V., Golovneva E.S. Dynamics of hyperchromic and MyoD-positive nuclei of regenerating skeletal muscles during infrared photomodulation. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):34–41 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.34-41.

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

Received 10.05.2023. **Received in revised form** 24.05.2023. **Accepted** 20.06.2023.

Введение

Миосателлитциты являются клетками камбиального резерва скелетной мышечной ткани. Известно, что данные клетки при световой микроскопии с использованием рутинных способов окрашивания отличаются мелким темным ядром, расположенным между сарколеммой и базальной мембраной. Установлено множество ядерных факторов, экспрессируемых в миосателлитцитах на разных стадиях активации. Так, в интактной зрелой поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани клетки-спутники митотически неактивны и экспрессируют Pax-7, c-met, сиаломуцин CD34, синдекан 3, Sox8, Sox15 и другие факторы транскрипции [1, 2]. При активации сателлитные клетки начинают экспрессировать специфичные для скелетных мышц факторы транскрипции, способствующие запуску пролиферации и дифференцировки (Myf5, MyoD).

В свою очередь, уровень экспрессии MyoD напрямую зависит от действия транскрипционных коактиваторов MASTR и MRTF-A [3].

Гиперхромные клетки в мышечных волокнах являются неактивными либо недавно активированными миосателлитцитами на морфологически неидентифицируемой стадии [4]. Тем не менее после деления, в процессе дифференцировки в собственные ядра мышечных волокон, возможно обнаружение MyoD⁺ крупных гипохромных ядер [1].

Миосателлитциты способны регулировать последующую дифференцировку [2]. Так, миосателлитцитам присущ и ассиметричный, и симметричный тип деления. При ассиметричном делении одна из клеток пойдет по пути дальнейшей дифференцировки, тогда как вторая останется в периоде G₀ или начнет подготовку к следующему делению. Ввиду этого ниша миосателлитцитов представляет собой саморегулирующуюся систему с многоступенчатым процессом активации специфических для миосателлитцитов экспрессируемых факторов [2, 5, 6].

Одним из наиболее универсальных лечебных воздействий, стимулирующих пролиферацию, усиливающих экспрессию генов, изменяющих проницаемость ионных каналов и воздействующих на активность ферментных систем клетки, является лазерная терапия [7–9]. В то же время эффекты инфракрасного лазера на репаративную регенерацию скелетных мышц в полной мере не изучены. В связи с этим целью исследования являлся анализ влияния длительности инфракрасного лазерного облучения на состояние клеток камбиального резерва в регенерирующей скелетной мышечной ткани.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе морфологической лаборатории многопрофильного центра лазерной медицины и кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета. Проведение исследования одобрено на заседании этического комитета Южно-Уральского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 21.02.2022). В эксперименте использованы 128 самцов крыс Вистар в возрасте 4–6 месяцев массой от 270 до 330 граммов. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Исходя из цели исследования, были сформированы четыре экспериментальные группы: 0 группа – интактный контроль (n=8); I группа (динамический контроль) – резаная рана *m. gastrocnemius* без дополнительного воздействия (n=40); II группа – резаная рана *m. gastrocnemius* с использованием инфракрасного лазерного облучения с экспозицией 60 секунд (n=40); III группа – резаная рана *m. gastrocnemius* с использованием инфракрасного лазерного облучения с экспозицией 180 секунд (n=40). Модель репаративной регенерации осуществлялась путем нанесения резаной травмы

под общим обезболиванием золетилом в дозе 5 мл/кг. Для доступа к икроножной мышце проводили разрез кожных покровов длиной 1 см на дорсальной поверхности задних конечностей ниже коленного сустава на 0,4–0,5 см в проекции *m. gastrocnemius*. Хирургическим скальпелем производили механическое повреждение мышцы путем выполнения перпендикулярного хода мышцы надреза на глубину 2 мм.

Лазером воздействовали сразу после нанесения резаной раны. Фотомодуляцию осуществляли лазерным аппаратом ЛС-097 («ИРЭ-Полус», Россия) с длиной волны 970 нм, мощность 1,0 Вт, в непрерывном режиме излучения. Обработку раневой поверхности *m. gastrocnemius* проводили с расстояния от световода до ткани 5,0 мм, сканирующими движениями.

Животных выводили из опыта на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента с помощью дислокации шейных позвонков под эфирным ингаляционным наркозом. Для дальнейшей гистотехнической обработки биоматериала фрагменты скелетной мышечной ткани *m. gastrocnemius* фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином (рН 7,2) в течение 24 часов. После стандартной гистологической проводки осуществляли заливку скелетных мышц, после чего готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). На полученных серийных срезах различали интактную, перифокальную и очаговую зоны. Очаговая зона отличалась наличием повреждений скелетных мышечных волокон, визуализируемых некротизированных участков, лимфогистиоцитарным инфильтратом, различающимся по клеточному составу на разных сроках эксперимента. Перифокальные участки окружали очаговую зону, отличаясь отсутствием видимых повреждений мышечных волокон. Интактные участки скелетной мышечной ткани имели ровные контуры, выраженную поперечную исчерченность, очаги соединительной ткани без инфильтрата, ядра располагались преимущественно по периферии мышечного волокна.

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах, нанесенных на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном. Последующая демаскировка антигенов проводилась при температуре +95–98°C в течение 25 минут. Постановка иммуногистохимической реакции осуществлялась с использованием антител к MyoD (Affinity Biosciences, КНР) и набора реагентов Novolink (Leica Biosystems, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Гистологические препараты анализировали с помощью микроскопа DM RXA (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой DFC 290 (Leica Microsystems, Германия), сопряженной с программой анализа изображений ImageScore M («Системы для микроскопии и анализа» (СМА), Россия). Показатель площади гипохромных ядер рассчитывали при $\times 1000$ (объектив $\times 100$; окуляры $\times 10$) с использова-

нием масляной иммерсии и функции «ручное выделение» в программе ImageScore M. Плотность расположения MyoD+ ядер рассчитывали путем мануального выделения площади мышечных волокон (в программе ImageScore M) с последующим подсчетом количества ядер, давших положительную окраску на MyoD, и дальнейшим разделением количества MyoD+ ядер на площадь мышечных волокон, содержащих в себе эти ядра. Количество измерений для каждого представленного значения было равно 40.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью лицензионных пакетов прикладных программ: Excel 2020 (Microsoft, США), PAST версии 4.12b (Hammer, 2023) и Statistica версии 12.5 (StatSoft, США). Для оценки достоверности различий использовался 4-факторный метод дисперсионного анализа ANOVA, апостериорные вычисления для сравнения показателей нескольких экспериментальных групп осуществлялись с использованием метода Тьюки. Данные представлены в виде среднего арифметического с указанием 95% доверительных интервалов. В том числе осуществлялся анализ совокупности массивов данных по срокам и зонам, а также по группам и зонам. Статистически значимыми считали различия при значении $p \leq 0,05$.

Результаты

В интактной *m. gastrocnemius* крысы площадь гиперхромных ядер составила 17,35 мкм² (15,94; 18,77). В группе динамического контроля достоверные различия по сравнению с интактной группой не выявлены.

При сравнении групп лазерного воздействия с динамическим контролем в 1-е сутки эксперимента в III группе животных (180 секунд) было обнаружено достоверное уменьшение площади гиперхромных ядер в интактной и перифокальной зонах мышечных волокон, во II группе (60 секунд) изменения не наблюдались (табл. 1). На 3-и сутки опыта площадь гиперхромных ядер достоверно не изменялась ни в одной из опытных групп. 7-е сутки характеризовались достоверным ростом показателя у животных III группы в очаговой и перифокальной зонах, а на 30-е сутки в этой же группе увеличивалась площадь гиперхромных ядер в зоне интактных мышц.

Для оценки тенденций влияния лазерного облучения на площадь гиперхромных ядер вне зависимости от срока эксперимента было использовано сравнение массивов данных групп. При этом обнаружено, что площадь гиперхромных ядер в группе лазерного облучения с экспозицией 180 секунд превышает показатели всех остальных групп. Так, площадь гиперхромных ядер в III группе животных составляла 16,90 мкм² (16,29; 17,50), тогда как в группе динамического контроля этот показатель был 15,91 мкм² (15,42; 16,40), $p=0,0041$, а во II группе животных 15,96 мкм² (15,43; 16,49), $p=0,0072$. Достоверные различия между показателями группы динамического контроля и II группы не обнаружены.

Таблица 1 | Table 1

Площадь гиперхромных ядер в регенерирующей *m. gastrocnemius*, среднее (–95%; +95%) |
 The area of hyperchromic nuclei in the regenerating *m. gastrocnemius*, mean (–95%; +95%)

Группа Group	Сутки Day				
	1-е Day 1	3-и Day 3	7-е Day 7	14-е Day 14	30-е Day 30
Интактная зона (и.) (мкм ²) Intact zone (i.) (μm ²)					
I группа (динамический контроль) Group I (dynamic control)	17,59 (15,66; 19,53)	13,88 (11,81; 15,95)	14,23 (12,43; 16,04)	16,64 (15,46; 17,83)	14,88 (13,66; 16,11)
II группа (лазер 60 секунд) Group II (60-second laser)	15,56 (13,78; 17,35)	12,17 (9,32; 15,02)	16,03 (13,74; 18,31)	17,53 (16,11; 18,95)	15,95 (14,88; 17,02)
III группа (лазер 180 секунд) Group III (180-second laser)	13,26 (11,88; 14,64)	17,22 (14,83; 19,61)	14,06 (12,31; 15,82)	14,64 (13,32; 15,96)	19,23 (17,87; 20,59)
Перифокальная зона (п.) (мкм ²) Perifocal zone (p.) (μm ²)					
I группа (динамический контроль) Group I (dynamic control)	16,22 (14,27; 18,19)	14,41 (13,77; 15,05)	13,36 (12,04; 14,68)	14,09 (12,65; 15,53)	18,69 (18,14; 19,25)
II группа (лазер 60 секунд) Group II (60-second laser)	15,58 (14,31; 16,87)	11,25 (10,51; 12,00)	14,47 (12,81; 16,14)	15,27 (13,33; 17,22)	16,62 (15,14; 18,10)
III группа (лазер 180 секунд) Group III (180-second laser)	13,15 (12,11; 14,20)	16,13 (14,17; 18,11)	19,82 (18,14; 21,52)	14,86 (13,71; 16,01)	19,23 (17,38; 21,09)
Очаговая зона (о.) (мкм ²) Focal zone (o.) (μm ²)					
I группа (динамический контроль) Group I (dynamic control)	16,90 (14,81; 19,00)	19,54 (16,53; 22,57)	14,26 (12,37; 16,17)	15,61 (13,89; 17,33)	18,30 (17,04; 19,57)
II группа (лазер 60 секунд) Group II (60-second laser)	18,79 (17,22; 20,38)	19,66 (18,18; 21,15)	17,97 (15,56; 20,38)	15,48 (14,16; 16,80)	17,00 (15,19; 18,82)
III группа (лазер 180 секунд) Group III (180-second laser)	15,42 (13,42; 17,44)	17,87 (15,24; 20,50)	21,49 (17,75; 25,22)	17,55 (16,12; 18,98)	19,49 (17,55; 21,43)
p-значение p-value	$P_{и.(III)-и.(I)}$ – 0,0236 $P_{п.(III)-п.(I)}$ – 0,0158	$P_{и.(I)-п.(II)}$ – 0,0001 $P_{п.(III)-п.(II)}$ – 0,0001	$P_{п.(III)-и.(I)}$ – 0,0002 $P_{о.(III)-о.(I)}$ – 0,0001		$P_{и.(III)-и.(I)}$ – 0,023 $P_{и.(III)-и.(II)}$ – 0,031
Интактный контроль (мкм ²) Intact control (μm ²): 17,35 (15,94; 18,77)					

При сравнении групп лазерного воздействия между собой выявлено, что в очаговой зоне площадь гиперхромных ядер не отличалась (табл. 1). В то же время в перифокальной зоне обнаружено увеличение показателя в мышцах с экспозицией лазера 180 секунд (III группа). В интактной зоне отмечалось увеличение площади гиперхромных ядер III группы на 3-и сутки по сравнению с показателем II группы.

Следующим этапом работы являлся анализ плотности расположения MyoD⁺ ядер, которые выявляются в активированных миосателлитоцитах, вставших на путь дифференцировки в собственные ядра скелетного мышечного волокна (рис. 1, 2). Было обнаружено достоверное увеличение плотности расположения MyoD⁺ ядер при сравнении групп интактного и динамического контроля. Так, установлено увеличение плотности расположения MyoD⁺ ядер в очаговой области на 7-е сутки

($p=0,0371$) и на 14-е сутки ($p=0,0465$) по сравнению со значениями группы интактного контроля.

Полученные данные свидетельствуют об увеличении плотности расположения MyoD⁺ ядер на 3-и сутки во II и III группах по сравнению с группой динамического контроля (табл. 2). На 7-е сутки плотность расположения MyoD⁺ ядер в скелетных мышцах II группы животных была выше по сравнению с III группой ($p=0,038$) (рис. 1).

При сравнении совокупности массивов данных по группам отмечалось достоверное ($p=0,0045$) увеличение количества MyoD⁺ ядер в выборке применения лазерного облучения продолжительностью 60 секунд (1672,34 [1527,06; 1817,63]) относительно группы динамического контроля (1399,92 [1288,04; 1511,79]). Для группы лазерного воздействия 180 секунд такая разница не обнаружена.

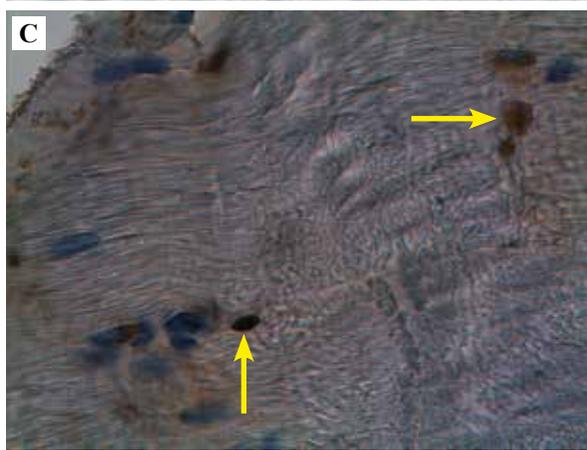
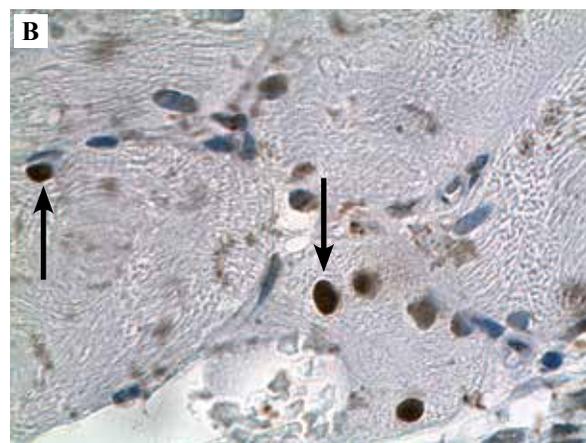
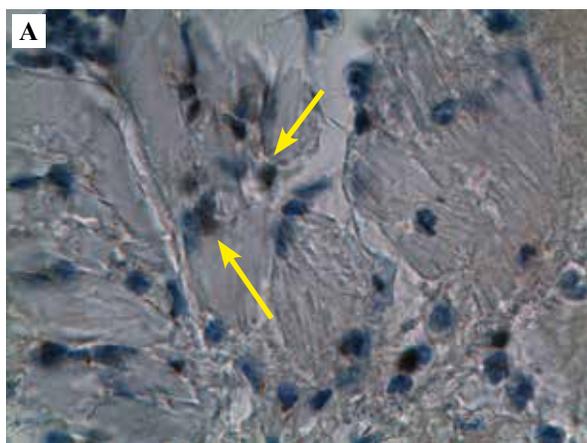


Рис. 1. Экспрессия MyoD на 1-е сутки (очаговая зона) (A), 7-е сутки (очаговая зона) (B) и 30-е сутки (очаговая зона) (C). II группа. Стрелки указывают на MyoD+ ядра. ИГХ с антителами к MyoD, гематоксилин, $\times 1000$

Fig. 1. MyoD expression, day 1 (focal zone) (A), day 7 (focal zone) (B), and day 30 (focal zone) (C). Group II. MyoD+ nuclei (arrows). IHC with antibodies to MyoD, hematoxylin, $\times 1000$

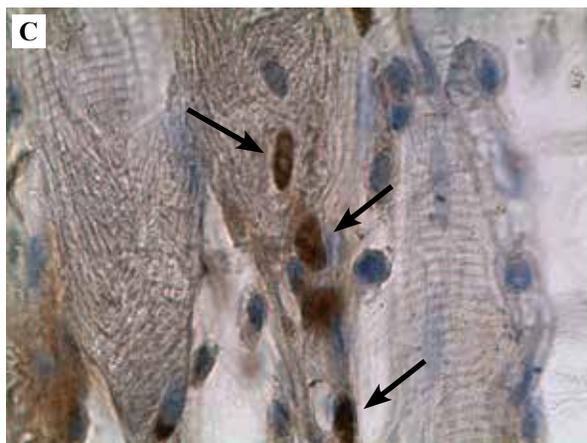


Рис. 2. Экспрессия MyoD в интактной (A), перифокальной (B) и очаговой (C) зонах регенерирующей скелетной мышечной ткани. 3-и сутки эксперимента. II группа. Стрелки указывают на MyoD+ ядра. ИГХ с антителами к MyoD, гематоксилин, $\times 1000$

Fig. 2. MyoD expression in the intact (A), perifocal (B), and focal (C) zones in the regenerating skeletal muscle tissue. Day 3 of the experiment. Group II. MyoD+ nuclei (arrows). IHC with antibodies to MyoD, hematoxylin, $\times 1000$

Таблица 2 | Table 2

Плотность расположения MyoD+ ядер в регенерирующей *m. gastrocnemius*, среднее (–95%; +95%) |
The density of MyoD+ cells in the regenerating *m. gastrocnemius*, mean (–95%; +95%)

Группа Group	Сутки Day				
	1-е Day 1	3-и Day 3	7-е Day 7	14-е Day 14	30-е Day 30
Интактная зона (п/мм ²) Intact zone (n/mm ²)					
I группа Group I	1063,30 (767,72; 1358,89)	939,75 (660,71; 1218,79)	1603,38 (1259,47; 1947,29)	1098,18 (701,84; 1494,52)	1347,32 (1095,40; 1599,23)
II группа Group II	1046,22 (897,61; 1194,82)	1238,58 (924,27; 1552,89)	1874,16 (1516,93; 2231,39)	1349,75 (1148,92; 1550,57)	1544,91 (1316,77; 1773,05)
III группа Group III	1029,95 (822,21; 1237,69)	865,64 (683,21; 1048,07)	1411,24 (1198,76; 1623,72)	1175,93 (949,48; 1402,39)	1028,04 (806,42; 1249,66)
Очаговая зона (п/мм ²) Focal zone (n/mm ²)					
I группа Group I	1480,11 (1230,61; 1729,61)	1192,03 (884,86; 1499,19)	1921,428 (1415,832; 2427,025)	1704,968 (1531,436; 1878,499)	1648,69 (1102,01; 2195,36)
II группа Group II	1704,48 (1217,01; 2191,96)	1952,32 (1573,24; 2331,40)	2694,25 (1728,80; 3659,71)	1700,72 (1339,36; 2062,08)	1618,02 (1327,60; 1908,45)
III группа Group III	1384,52 (1225,80; 1543,23)	1804,86 (1467,08; 2142,64)	1796,69 (1618,52; 1974,85)	1746,96 (1087,44; 2406,48)	1291,99 (1145,94; 1438,03)
p-значение p-value		$P_{o(II)-o(I)} = 0,0267$ $P_{o(III)-o(I)} = 0,0436$	$P_{o(II)-o(III)} = 0,0387$		
Интактный контроль (п/мм ²) Intact control (n/mm ²): 1241,27 (1011,09; 1471,45)					

Обсуждение

Гиперхромные ядра скелетных мышечных волокон являются неактивными или недавно активированными миосателлитоцитами, дифференцирующимися в светлые гипохромные собственные ядра скелетных мышечных волокон [1, 2, 7]. Однако при оценке миосателлитоцитов в регенерирующей скелетной мышце по степени конденсации хроматина упускаются дифференцирующиеся собственные ядра, еще экспрессирующие факторы, присущие миосателлитоцитам, но уже ими не являющиеся и имеющие светлое ядро [1, 2, 6]. Увеличение площади гиперхромных ядер может свидетельствовать о направлении их активности в сторону дифференцировки. В то же время увеличение количества MyoD+ ядер (активированных миосателлитоцитов) указывает на активную пролиферацию и дифференцировку миосателлитоцитов [2, 6, 10]. При этом вновь вошедшие в G₀ и прекратившие дифференцировку миосателлитоциты не экспрессируют больше MyoD+ [1]. Таким образом, увеличение плотности распределения MyoD+ ядер на 3-и сутки после лазерного воздействия предшествует последующему увеличению

площади гиперхромных ядер на 7-е сутки, поскольку увеличение количества активированных клеток может приводить к пополнению относительного дефицита ниши миосателлитоцитов при регенерации и увеличению количества дифференцирующихся ядер, что необходимо для дальнейшего восстановления скелетных мышц. Выраженным влиянием на увеличение количества активированных миосателлитоцитов обладала короткая экспозиция лазера (60 секунд).

Эксперимент показал, что после лазерного воздействия с экспозицией 180 секунд на рану скелетной мышцы площадь гиперхромных ядер миосателлитоцитов может меняться разнонаправленно. Первоначальное уменьшение площади ядер сменяется на 7-е сутки ее увеличением. Удлинение лазерного воздействия с 60 до 180 секунд приводит к более выраженному увеличению площади гиперхромных ядер (при сравнении массивов данных без учета срока опыта) [11, 12]. Полученные нами результаты свидетельствуют о дозозависимом влиянии инфракрасной фотобиомодуляции на показатель площади ядер, что согласуется с данными литературы [13, 14]. Выявленное увеличение площади

гиперхромных ядер на 7-е сутки говорит о длительном стимулирующем влиянии однократного лазерного облучения [15–17].

Временной отрезок с 1-х суток и до 7-х, на протяжении которого в разных зонах поврежденной мышцы происходят значимые изменения площади гиперхромных ядер, отражает не только ответные реакции миосателлитоцитов (деление, в том числе асимметричное, дифференцировку), но и процессы, происходящие в поврежденной мышце в целом. Так, в исследовании T. Compton et al. установлено, что лазерное воздействие с длиной волны 670 нм и экспозицией 5 минут приводило к увеличению количества сосудов, уменьшению отека и инфильтрата в регенерирующей скелетной мышечной ткани на 7-е сутки [14]. Подобный результат был получен при исследовании физиологической регенерации скелетной мышечной ткани в ходе тренировочного процесса, при приеме ВСАА (branched-chain amino acids/аминокислоты с разветвленной боковой цепью) и лазерном облучении (980 нм, 60 секунд) [6] и влияния фотомодуляции на площадь ядер и количество миосателлитов в регенерирующей мышце у животных разных возрастных групп [7].

Обращает на себя внимание, что площадь гиперхромных ядер на 30-е сутки в группе фотомодуляции с экспозицией 180 секунд практически не отличается в очаговой, перифокальной и интактной зонах скелетной мышечной ткани. Эти данные свидетельствуют о расширении области регенеративных процессов и могут указывать на более полноценную репарацию скелетных мышечных волокон [18, 19]. В то же время у животных контрольной группы площадь гиперхромных ядер в перифокальной и очаговой зонах достоверно больше и не соответствует значению показателя в интактной зоне, что может указывать на более хронологически ранний этап репаративного процесса, для которого характерно выраженное увеличение в зоне очаговых изменений, и меньшую степень его завершенности [19, 20].

Заключение

После применения инфракрасного лазера с экспозицией 60 секунд преимущественно повышается плотность расположения MyoD⁺ ядер, а более длительное лазерное воздействие (180 секунд) влияет на прирост площади гиперхромных ядер мышечной ткани.

Так как инфракрасная фотобиомодуляция способствует увеличению количества и дифференцировки активированных миосателлитоцитов, это приводит к ускоренному восстановлению скелетных мышц на модели резаной раны.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Р.В. Тахавиев, Е.С. Головнева.

Сбор и обработка материала – Р.В. Тахавиев.

Написание текста – Р.В. Тахавиев.

Редактирование – Г.В. Брюхин, Е.С. Головнева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – R.V. Takhaviev, E.S. Golovneva.

Collected the data and performed the analysis – R.V. Takhaviev.

Wrote the paper – R.V. Takhaviev.

Edited the manuscript – G.V. Bryukhin, E.S. Golovneva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Jankowski M, Mozdzia P, Petite J, Kulus M, Kempisty B. Avian satellite cell plasticity. *Animals (Basel)*. 2020;10(8):1322. DOI: 10.3390/ani10081322.
2. Pang KT, Loo LSW, Chia S, Ong FYT, Yu H, Walsh I. Insight into muscle stem cell regeneration and mechanobiology. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):129–40. DOI: 10.1186/s13287-023-03363-y.
3. Song R, Zhao S, Xu Y, Hu J, Ke S, Li F et al. MRTF-A regulates myoblast commitment to differentiation by targeting PAX7 during muscle regeneration. *J Cell Mol Med*. 2021;25(18):8645–61. DOI: 10.1111/jcmm.16820.
4. Rajasekaran NS, Shelar SB, Jones DP, Hoidal JR. Reductive stress impairs myogenic differentiation. *Redox Biol*. 2020;34:101492. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101492.
5. Wiedmer P, Jung T, Castro JP, Pomatto LCD, Sun PY, Davies KJA et al. Sarcopenia – molecular mechanisms and open questions. *Ageing Res Rev*. 2021;65:101200. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101200.
6. Галлямутдинов Р.В., Головнева Е.С., Ревель-Муроз Ж.А., Еловских И.В. Инфракрасное лазерное воздействие в комбинации с приемом аминокислот с разветвленной боковой цепью стимулирует физиологическую адаптацию скелетных мышц. *Лазерная медицина*. 2021;25(3):40–46. DOI: 10.37895/2071-8004-2021-25-3-40-46.
7. Галлямутдинов Р.В., Головнева Е.С., Брюхин Г.В. Влияние инфракрасного лазерного излучения и приема аминокислот на адаптацию сосудистого русла межмышечной соединительной ткани к физическим нагрузкам в эксперименте. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2022;1(19):158–161. DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-158-161.
8. Gallyamutdinov RV, Golovneva ES, Bryukhin GV. Effect of infrared laser radiation and amino acid intake on the vascular bed adaptation of the intermuscular connective tissue to physical activity. *Journal of Volgograd State Medical University*. 2022;1(19):158–161 (In Russ.). DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-158-161.
9. Andreo L, Ribeiro BG, Alves AN, Martinelli ASA, Soldera CB, Horliana ACRT et al. Effects of photobiomodulation with low-level laser therapy on muscle repair following a peripheral nerve injury in Wistar rats. *Photochem Photobiol*. 2020;96(5):1124–32. DOI: 10.1111/php.13255.

9. *Vieira WF, Kenzo-Kagawa B, Alvares LE, Cogo JC, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA.* Exploring the ability of low-level laser irradiation to reduce myonecrosis and increase Myogenin transcription after Bothrops jararacussu envenomation. *Photochem Photobiol Sci.* 2021;20(4):571–83. DOI: 10.1007/s43630-021-00041-x.
10. *Minai L, Yelin D.* Plasmonic fusion between fibroblasts and skeletal muscle cells for skeletal muscle regeneration. *Biomed Opt Express.* 2022;13(2):608–19. DOI: 10.1364/BOE.445290.
11. *da Silva EM, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Magalhães EMR, Bussadori SK, De Brito A et al.* The effects of photobiomodulation on inflammatory infiltrate during muscle repair in advanced-age rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020;75(3):437–41. DOI: 10.1093/gerona/glz076.
12. *Gonzalez AC, Santos ET, Freire TFC, Sá MF, Andrade ZA, Medrado ARAP.* Participation of the immune system and hedgehog signaling in neoangiogenesis under laser photobiomodulation. *J Lasers Med Sci.* 2019;10(4):310–6. DOI: 10.15171/jlms.2019.50.
13. *Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M.* Photobiomodulation dose parameters in dentistry: a systematic review and meta-analysis. *Dent J (Basel).* 2020;8(4):114. DOI: 10.3390/dj8040114.
14. *Compton T, Poellinger N, Struve J, Krolkowski JG, Ninomiya JT, Weihrauch D.* Non-thermal infrared light treatment of ischemia/reperfusion injury and subsequent analysis of macrophage differentiation. *J Vis Exp.* 2021;(178). DOI: 10.3791/62908.
15. *Leyane TS, Jere SW, Houreld NN.* Cellular signalling and photobiomodulation in chronic wound repair. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):11223. DOI: 10.3390/ijms222011223.
16. *Reis CHB, Buchaim DV, Ortiz AC, Fideles SOM, Dias JA, Miglino MA et al.* Application of fibrin associated with photobiomodulation as a promising strategy to improve regeneration in tissue engineering: a systematic review. *Polymers (Basel).* 2022;14(15):3150. DOI: 10.3390/polym14153150.
17. *Pinto H, Goñi Oliver P, Sánchez-Vizcaino Mengual E.* The effect of photobiomodulation on human mesenchymal cells: a literature review. *Aesthetic Plast Surg.* 2021;45(4):1826–42. DOI: 10.1007/s00266-021-02173-y.
18. *Della Santa GML, Ferreira MC, Machado TPG, Oliveira MX, Santos AP.* Effects of photobiomodulation therapy (LED 630 nm) on muscle and nerve histomorphometry after axonotmesis. *Photochem Photobiol.* 2021;97(5):1116–22. DOI: 10.1111/php.13415.
19. *Fukada SI, Akimoto T, Sotiropoulos A.* Role of damage and management in muscle hypertrophy: different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(9):118742. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118742.
20. *Коняева А.Д., Варакута Е.Ю., Лейман А.Е., Больбасов Е.Н., Станкевич К.С.* Изменения клеточного состава воспалительного инфильтрата и соединительной ткани слизистой оболочки полости рта крыс при регенерации раны с использованием защитного пьезоэлектрического покрытия. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(1):50–61. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.50-61.
- Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov EN, Stankevich KS.* Changes in the cellular composition of the inflammatory infiltrate and connective tissue of the oral mucosa in rats during wound healing using a protective piezoelectric coating. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(1):50–61 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.50-61.

Информация об авторах

Ростислав Винерович Тахавиев – ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Геннадий Васильевич Брюхин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Елена Станиславовна Головнева – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Author information

Rostislav V. Takhaviev – Assistant, Histology, Embryology and Cytology Department, South Ural State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-8994-570X>

Gennady V. Bryukhin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Histology, Embryology and Cytology Department, South Ural State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-3898-766X>

Elena S. Golovneva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Normal Physiology Department, South Ural State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-6343-7563>

Влияние п-тирозола на морфофункциональные изменения сосудов слизистой оболочки губы в условиях экспериментального стоматита

А.Д. Коняева¹, Н.Н. Байтингер¹, Е.Ю. Варакута¹, Л.Р. Мустафина¹,
С.В. Логвинов¹, А.В. Герасимов¹, А.В. Потапов¹, М.Б. Плотников²

¹ ФГОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга –

филиал ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Резюме. Введение. Неспецифическим патогенетическим звеном воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта является окислительный стресс, деструктивно влияющий на ее структуру и функцию. В связи с этим природные антиоксиданты, такие как п-тирозол, вызывают большой интерес у исследователей. Цель работы – изучение влияния п-тирозола на морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла губы при экспериментальном стоматите.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 72 крысах линии Вистар, у которых моделировали стоматит. Крыс поделили на четыре группы – контрольную (интактные животные) (n=18), с ожогом без лечения (n=18), с ожогом и последующей аппликацией п-тирозола (n=18), с ожогом и лечением (лидокаин + экстракт ромашки аптечной) (n=18).

Результаты. У животных с применением п-тирозола на 3-и, 7-е и 12-е сутки наблюдались наименьшие значения измененных сосудов, индекса перикапиллярной диффузии и индекса Керногана, а плотность неизмененных артериол, венул и капилляров была наибольшей. Выраженная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) выявлена у животных 3-й группы на 7-е и 12-е сутки и 4-й группы на 12-е.

Заключение. На фоне аппликации п-тирозола происходило усиление кровоснабжения в зоне репарации слизистой оболочки губы за счет увеличения плотности неизмененных микрососудов и, соответственно, объема крови, поступающей в область раны, а также из-за прорастания имеющихся в регионе сосудов и индукции неоангиогенеза.

Ключевые слова: п-тирозол, Родиола розовая, слизистая оболочка губы, ангиогенез, антиоксидант

Для корреспонденции: Анастасия Денисовна Коняева. E-mail: asyakonya95@gmail.com

Для цитирования: Коняева А.Д., Байтингер Н.Н., Варакута Е.Ю., Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Герасимов А.В., Потапов А.В., Плотников М.Б. Влияние п-тирозола на морфофункциональные изменения сосудов слизистой оболочки губы в условиях экспериментального стоматита. Клин. эксп. морфология. 2024;13(1):42–49. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.42-49.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 15.05.2023. Получена после рецензирования 29.05.2023. Принята в печать 20.06.2023

Exploring the effect of p-tyrosol on vascular morphofunctional changes in lip mucous membrane during experimental stomatitis

A.D. Koniaeva¹, N.N. Baitinger¹, E.Yu. Varakuta¹, L.R. Mustafina¹,
S.V. Logvinov¹, A.V. Gerasimov¹, A.V. Potapov¹, M.B. Plotnikov²

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine – branch of Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

Abstract. Introduction. Oxidative stress is a non-specific pathogenetic link in inflammatory diseases of the oral mucosa, which has a destructive effect on its structure and function. In this regard, natural antioxidants such as (p-tyrosol) are of great interest to researchers. The purpose of this paper was to study the effect of p-tyrosol on the morphofunctional changes in the microcirculatory during experimental stomatitis.

Materials and methods. The experiment was carried out on 72 Wistar rats with experimental stomatitis. The animals were divided into four groups, each including 18 subjects: the control (intact rats; group 1),

with the burn and no treatment (group 2), with the burn and subsequent administration of p-tyrosol (group 3), and with the burn and subsequent administration of Lidocaine + Chamomile flower extract (group 4).

Results. The animals of group 3 had the smallest values of the altered vessels, the precapillary diffusion index and the Kernogan index on days 3, 7, and 12. On the contrary, the numerical density of the unchanged arterioles, venules, and capillaries was the greatest. VEGF expression was detected in group 3 on days 7 and 12, and in group 4, on day 12, thus indicating a more intense angiogenesis.

Conclusion. On the background of p-tyrosol administration, there is an increased blood supply in the treated area due to the following factors: a growing density of unchanged microvessels, the germination of the vessels in the treated area, and induced angiogenesis.

Keywords: p-tyrosol, *Rhodiola rosea*, mucous membrane of the lip, angiogenesis, antioxidant

Corresponding author: Anastasiia D. Koniaeva. E-mail: asyakonya95@gmail.com

For citation: Koniaeva A.D., Baitinger N.N., Varakuta E.Yu., Mustafina L.R., Logvinov S.V., Gerasimov A.V., Potapov A.V., Plotnikov M.B. Exploring the effect of p-tyrosol on vascular morphofunctional changes in lip mucous membrane during experimental stomatitis. *Clin. exp. morphology.* 2024;13(1):42–49 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.42-49.

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

Received 15.05.2023. **Received in revised form** 29.05.2023. **Accepted** 20.06.2023.

Введение

Окислительный стресс – неспецифическое патогенетическое звено воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта, деструктивно влияющее на ее структуру и функцию [1]. Антиоксидантная терапия способствует устойчивости организма против токсических внутриклеточных реакций, индуцированных свободными радикалами [2]. Синтетические антиоксиданты обладают целым рядом побочных эффектов, в связи с чем природные антиоксиданты вызывают большой интерес у исследователей [3]. Одним из представителей группы антиоксидантов природного происхождения является п-тирозол, выделенный из корневищ растений рода Родиола семейства Толстянковые [4]. Современные исследования выявили антиоксидантные, адаптогенные, антистрессовые, противомикробные, иммуномодулирующие и ангиомодулирующие свойства соединений, выделенных из растения Родиола розовая (*Rhodiola rosea*) [5].

Важную роль в процессе заживления ран играет сосудистая система, вокруг которой происходят регенераторные и гиперпластические процессы [6]. Тем не менее влияние антиоксиданта п-тирозола на изменения сосудов микроциркуляторного русла не было исследовано [7].

Цель работы – изучить влияние п-тирозола на морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла при экспериментальном стоматите.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 72 половозрелых крысах – самцах линии Вистар в возрасте 3 месяцев массой 250–300 граммов. Крысы были разделены на четыре группы: 1-я группа (n=18) – контрольная (интактные животные), 2-я группа (n=18) – контрольная, которой под внутримышечным наркозом препаратом золетил был смоделирован стоматит аппликацией 5% раствора гидроксида натрия (едкий натр) на 10 секунд в область губы на уровне нижних резцов, 3-я группа (n=18) – экспериментальная, ко-

торой аналогичным образом был смоделирован стоматит и проведена коррекция гелем для местного применения на основе п-тирозола (25 мг/г), растворенного в крахмальной слизи, 4-я группа (n=18) – экспериментальная, которой после моделирования стоматита проводили леченные гелем для местного применения на основе лидокаина + экстракта ромашки аптечной (*lidocaine + chamomillaecicutitae floridis extract*) (20 мг + 185 мг/г). Гели наносили на очаг воспаления 3 раза в сутки в течение 12 дней. Забор материала для морфометрического исследования осуществляли на 3-и, 7-е и 12-е сутки эксперимента. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с директивой Европейского парламента № 2010/63EU от 22.09.2010 «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Исследование одобрено локальным этическим комитетом от 27.03.2017, протокол № 5223/1. Животных выводили из эксперимента, помещая их в CO₂-камеру (ZOONLAB, Германия).

Проводку материала для гистологических препаратов выполняли по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином. После приготовления серийных парафиновых срезов толщиной 4–6 мкм осуществляли их депарафинизацию, затем иммуногистохимическое окрашивание, для которого использовали кроличьи рекомбинантные поликлональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF A) изотипа IgG (Abcam, США).

Для морфометрического исследования структур слизистой оболочки использовали программу AxioVision Rel 4.8 фирмы Carl Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging, Германия). На каждом гистологическом срезе изучали по 50 полей зрения в зоне ожога при помощи микроскопа (Leica Microsystems, Германия): объектив ×40 и ×90, окуляры ×10. В очаге поражения определяли плотность сосудов (количество подсчитываемых сосудов в 1 мм² среза) микроциркуляторного русла со сладжем или тромбозом и неизмененных микрососудов в 1 мм² среза; зону перикапиллярной диффузии (ЗПКД)

(площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр) как соотношение среднего диаметра капилляров к их удельной площади, индекс Керногана (ИК) (показатель пропускной способности микроциркуляторного русла) как соотношение толщины сосудистой стенки артериол к радиусу их просвета. Интенсивность иммуногистохимической окраски оценивали по шкале, рекомендованной МакКарти: 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание, 3 – сильное окрашивание [8, 9].

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для проверки статистических гипотез на характер распределения признака использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану и квартили, Me (Q1; Q3). При сравнении независимых выборок использовали критерий Краскала–Уоллиса с медианным тестом, для парных сравнений – кри-

терий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На 3-и сутки при гистологическом исследовании биоптатов слизистой оболочки губы во всех группах в месте щелочного ожога обнаруживались полное слущивание эпителиального пласта и некроз соединительной ткани до подслизистого слоя. Подслизистая основа была отечна, с очагами воспалительной инфильтрации вокруг раны. Микрососуды на периферии раневого дефекта характеризовались полнокровием с явлениями периваскулярной воспалительной инфильтрации, сочетающимся с гемодинамическими нарушениями в виде сладжа или тромбоза, что приводило к развитию ишемии (рис. 1 А). Количественный анализ плотности сосудов показал, что у животных с коррекцией п-тирозолом достоверно наблюдались наименьшие показатели измененных сосудов по сравнению с крысами 2-й и 4-й групп (табл.).

Таблица | Table

Морфометрическая характеристика микрососудов слизистой оболочки губы, М (Q₁; Q₃) |
Morphometric characteristics of the lip mucosa vessels, M (Q₁; Q₃)

Параметр Parameter	Сутки Days	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	4-я группа Group 4	Контроль Control
Плотность измененных артериол Density of changed arterioles	3	5,3 (3,3; 5,6)*#	3,3 (3,1; 3,8)*&	4,9 (4,4; 5,1)*#	0
	7	3,9 (2,9; 4,1)*#	2,6 (2,5; 2,9)*&	3,38 (3,1; 4,1)*#	
	12	2,4 (2,2; 2,8)*#&	0&	1,9 (1,4; 2,3)*#	
Плотность неизмененных артериол Density of unchanged arterioles	3	31,2 (29,8; 33,4)*#&	54,4 (48,9; 56,4)*&	37,7 (32,4; 41,2)*#	65,3 (63,2; 65,6)
	7	33,3 (29,8; 35,3)*#	56,6 (51,3; 61,2)*&	39,8 (37,2; 41,2)*#	
	12	39,5 (37,4; 43,2)*#	67,2 (64,3; 71,2)&	42,3 (39,9; 45,3)*#	
Плотность измененных венул Density of changed venules	3	14,2 (10,1; 18,2)*#	10,4 (9,8; 12,2)*&	12,2 (10,1; 14,3)*#	0
	7	10,6 (9,9; 12,2)*#	5,6 (4,5; 6,1)*&	9,5 (9,1; 11,1)*#	
	12	6,5 (5,9; 7,1)*#&	0&	3,4 (3,2; 3,6)*#	
Плотность неизмененных венул Density of unchanged venules	3	51,4 (47,7; 53,3)*#	68,8 (64,3; 72,2)*&	54,4 (51,2; 62,3)*#	86,1 (85,0; 89,2)
	7	53,4 (45,2; 55,6)*#	76,6 (70,1; 81,2)*&	56,6 (51,2; 61,2)*#	
	12	55,1 (53,4; 61,3)*#&	88,2 (79,2; 93,5)&	63,8 (56,6; 68,2)*#	
Плотность открытых капилляров Density of open capillaries	3	110,2 (109,2; 121,2)*#	139,4 (133,4; 141,3)*&	119,2 (116,7; 131,4)*#	172,0 (161,9; 179,0)
	7	113,4 (107,4; 121,6)*#	145,6 (134,2; 149,2)*&	124,4 (119,4; 128,8)*#	
	12	116,5 (111,6; 124,3)*#&	175,7 (164,3; 178,3)&	132,3 (122,2; 136,5)*#	
Индекс Керногана Kernogan index	3	1,21 (1,17; 1,25)*#&	0,81 (0,77; 0,83)*&	1,05 (0,99; 1,11)*#	0,58 (0,49; 0,6)
	7	1,08 (0,96; 1,13)*#	0,72 (0,68; 0,77)*&	1,04 (0,97; 1,08)*#	
	12	0,86 (0,82; 0,88)*#&	0,6 (0,54; 0,62)&	0,71 (0,68; 0,73)*#	
Зона перикапиллярной диффузии Pericapillary diffusion zone	3	3,3 (3,31; 4,12)*#	4,9 (4,05; 5,56)*&	3,8 (3,3; 3,9)*#	6,1 (5,7; 6,3)
	7	4,3 (4,02; 4,5)*#	5,5 (5,2; 5,9)*#&	4,5 (4,23; 4,8)*#	
	12	4,8 (4,56; 5,46)*#	6,4 (5,7; 6,9)&	5,2 (4,9; 5,4)*#	

Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия: * – от контрольной группы, # – от 3-й группы с п-тирозолом, & – от 4-й группы
Statistically significant ($p < 0,05$): * – from the control group, # – from group 3, & – from group 4

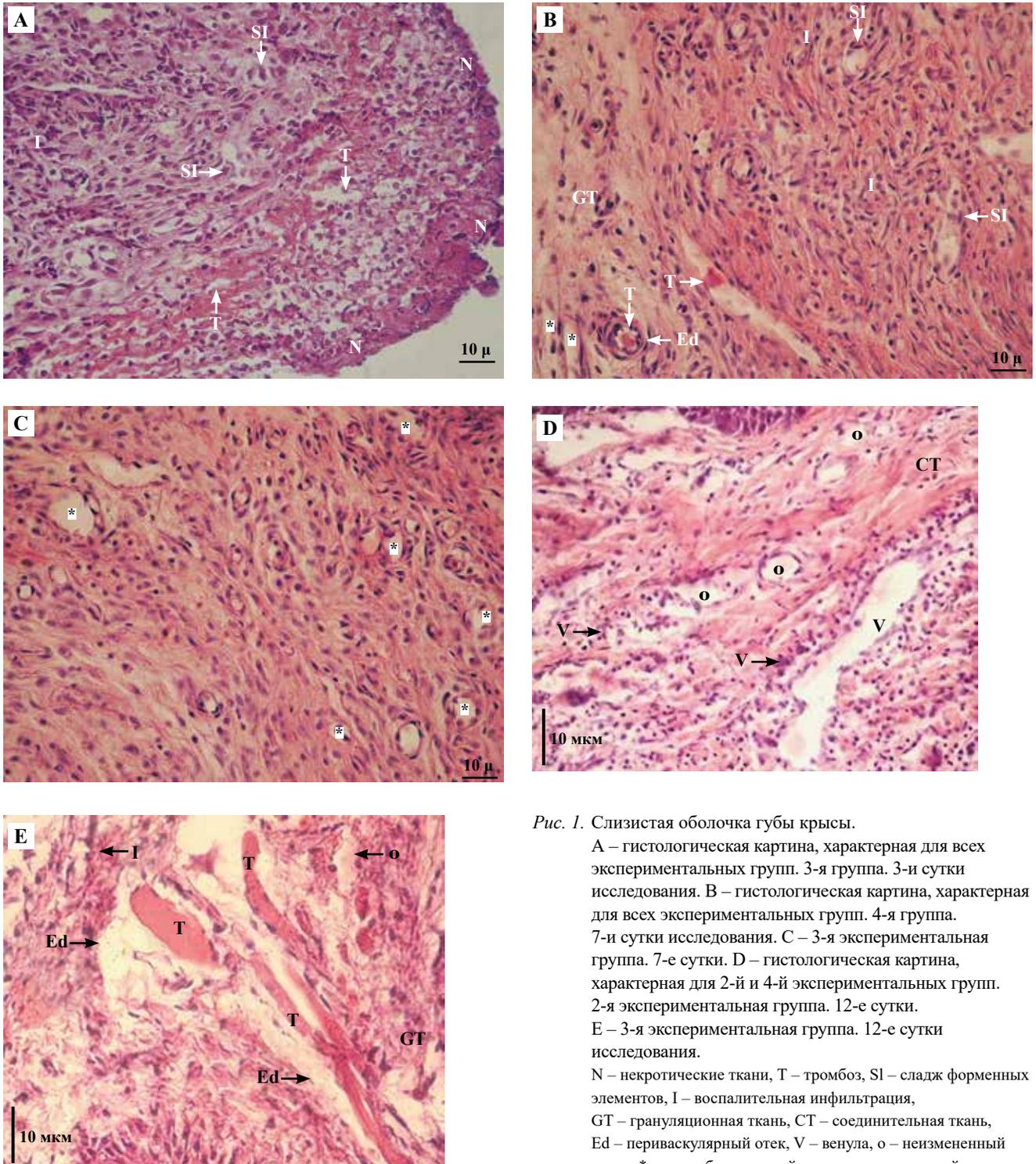


Рис. 1. Слизистая оболочка губы крысы.

А – гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-я группа. 3-и сутки исследования. В – гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. 4-я группа. 7-и сутки исследования. С – 3-я экспериментальная группа. 7-е сутки. D – гистологическая картина, характерная для 2-й и 4-й экспериментальных групп. 2-я экспериментальная группа. 12-е сутки. E – 3-я экспериментальная группа. 12-е сутки исследования.
 N – некротические ткани, T – тромбоз, SI – сгусток форменных элементов, I – воспалительная инфильтрация, GT – грануляционная ткань, CT – соединительная ткань, Ed – периваскулярный отек, V – венула, o – неизменный сосуд, * – новообразованный сосуд грануляционной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 1. The mucous membrane of the rat lips.

A – histological picture characteristic of all experimental groups. Group 3. Day 3. B – histological picture characteristic of all experimental groups. Group 4. Day 7. C – Group 3. Day 7. D – histological picture characteristic of groups 2 and 4. Group 2. Day 12. E – Group 3. Day 12.
 N – necrotic tissues, T – thrombosis, SI – sludge of blood elements, I – inflammation infiltration, GT – granulation tissue, CT – connective tissue, Ed – perivascular edema, V – venule, o – unchanged vessel, * – newly formed vessel of granulation tissue. H&E stain, $\times 400$

В очаге поражения у группы животных с коррекцией п-тирозолом ЗПКД была в 1,3 раза ($p=0,035$) выше, чем у животных 4-й группы, и в 1,5 раза ($p=0,029$) больше, чем во 2-й группе, но при этом в 1,3 раза меньше, чем в группе контроля ($p=0,031$). Индекс Керногана достоверно был меньше – в 1,5 раза у животных 3-й группы по сравнению с таковым во 2-й группе ($p=0,015$) и в 1,3 раза, чем в 4-й.

На 7-е сутки у животных 3-й группы в подслизистой основе губы была умеренно выражена отечность с единичными очагами воспалительной инфильтрации вокруг раны. Микрососуды по большей части были расширенными и запустевшими, у крыс 2-й и 4-й групп вокруг раны выявлялась выраженная воспалительная инфильтрация, просвет большинства сосудов был резко сужен из-за периваскулярного отека, наблюдались явления тромбоза и сладжа (рис. 1 В). У животных 3-й группы в зоне ожога превалировало разрастание созревающей грануляционной соединительной ткани с новообразованными сосудами (рис. 1 С). У животных 4-й группы наблюдалось увеличение плотности измененных артериол и венул в 1,3 и 1,7 раза ($p=0,023$, $p=0,025$), соответственно, по сравнению с показателями животных 3-й группы. У животных 2-й группы значимо увеличивалась плотность измененных артериол и венул, в 1,5 и 1,9 раза ($p=0,044$, $p=0,043$), соответственно, по сравнению с аналогичным показателем животных 3-й группы. Плотность капилляров на периферии дефекта в 3-й группе была в 1,2 и 1,3 достоверно больше, чем в 4-й и 2-й группах ($p=0,033$, $p=0,022$), соответственно, но в 1,2 раза значимо меньше, чем в 1-й группе ($p=0,046$) (табл.).

Применение п-тирозола оказывало положительный эффект на состояние сосудов слизистой оболочки губы, что на уровне количественного анализа выражалось в увеличении плотности неизмененных артериол, венул и капилляров. Наблюдалось достоверное увеличение ЗПКД в 1,2 раза ($p=0,033$) и уменьшение ИК в 1,5 раза ($p=0,044$), соответственно, у животных 3-й группы по сравнению с животными, не получавшими лечение. При этом ЗПКД в 3-й группе достигала контрольных значений ($p=0,077$) (табл.).

Интенсивность реакции с антителами к VEGF на 7-е сутки во 2-й и 4-й группах была слабоположительной, в 3-й – умеренной (рис. 2 А, В).

К 12-м суткам эксперимента у животных 3-й группы в очаге поражения наблюдались активные процессы замещения грануляционной ткани на зрелую соединительную ткань с созреванием сосудов микроциркуляторного русла (рис. 1 D), в то время как у крыс 2-й и 4-й групп обнаруживались обширные очаги грануляционной ткани (рис. 1 E).

У животных 2-й и 4-й групп сохранялись патологические изменения сосудов в виде сладжа и тромбоза по периферии от экспериментальной области (рис. 1). Так, плотность открытых артериол и венул у животных с коррекцией п-тирозолом была в 1,6 и 1,4 раза

($p=0,025$, $p=0,023$), соответственно, выше показателей 4-й группы и в 1,7 и 1,6 раза ($p=0,039$, $p=0,033$), соответственно, больше аналогичных показателей 2-й группы. Также в группе с коррекцией п-тирозолом наблюдались максимальные значения плотности капилляров, которая в 1,5 раза значимо превышала аналогичные значения во 2-й и 4-й группах – в 1,5 и 1,3 раза ($p=0,034$, $p=0,029$), соответственно (табл.).

Важно отметить, что показатели плотности неизмененных капилляров, измененных сосудов, ИК и ЗПКД в 3-й группе соответствовали показателям группы контроля ($p>0,05$), в то время как во 2-й и 4-й группах эти показатели по-прежнему имели достоверные отличия с интактной слизистой оболочкой ($p>0,05$) (табл.). Кроме того, в 3-й группе исчез периваскулярный отек, практически не обнаруживались очаги воспалительной инфильтрации вокруг сосудов.

Реакция с антителами к VEGF была умеренной у животных 2-й группы и сильной у крыс 3-й и 4-й групп (рис. 2 С, D).

Обсуждение

По результатам данного исследования выявлены следующие закономерности восстановления микроциркуляторного русла в условиях экспериментального стоматита. У животных 2-й и 4-й групп наблюдались выраженное снижение плотности неизмененных микрососудов и увеличение плотности артериол и венул с явлениями сладжа, тромбоза по сравнению с показателями животных 3-й группы, в которой все подсчитываемые показатели достигали контрольных значений на 12-е сутки исследования. Сохранение данных патологических изменений во 2-й и 4-й группах на момент окончания исследования свидетельствовало о нарушении микроциркуляции и, как следствие, об ишемии тканей в области раневой поверхности.

В нашей работе полнокровные сосуды с признаками сладжа и тромбоза, окруженные воспалительной инфильтрацией, обнаруживались преимущественно в группе без коррекции п-тирозолом, что соответствует данным уже опубликованных исследований, которые доказали наличие у вещества способности улучшать деформируемость эритроцитов и снижать агрегацию тромбоцитов, на фоне которой уменьшаются дистрофические и воспалительные изменения в слизистой оболочке губы [10–12]. Также известно, что ожоговая травма сопровождается появлением продуктов перекисного окисления липидов [13], п-тирозол, в свою очередь, обладает антиоксидантной активностью [5], что способствует стабилизации клеточных мембран эндотелиоцитов [14].

В очаге поражения у группы животных с коррекцией п-тирозолом наблюдалась положительная динамика восстановления косвенных показателей гемодинамики, таких как ЗПКД и ИК, которые к 12-м суткам полностью соответствовали значениям показателей

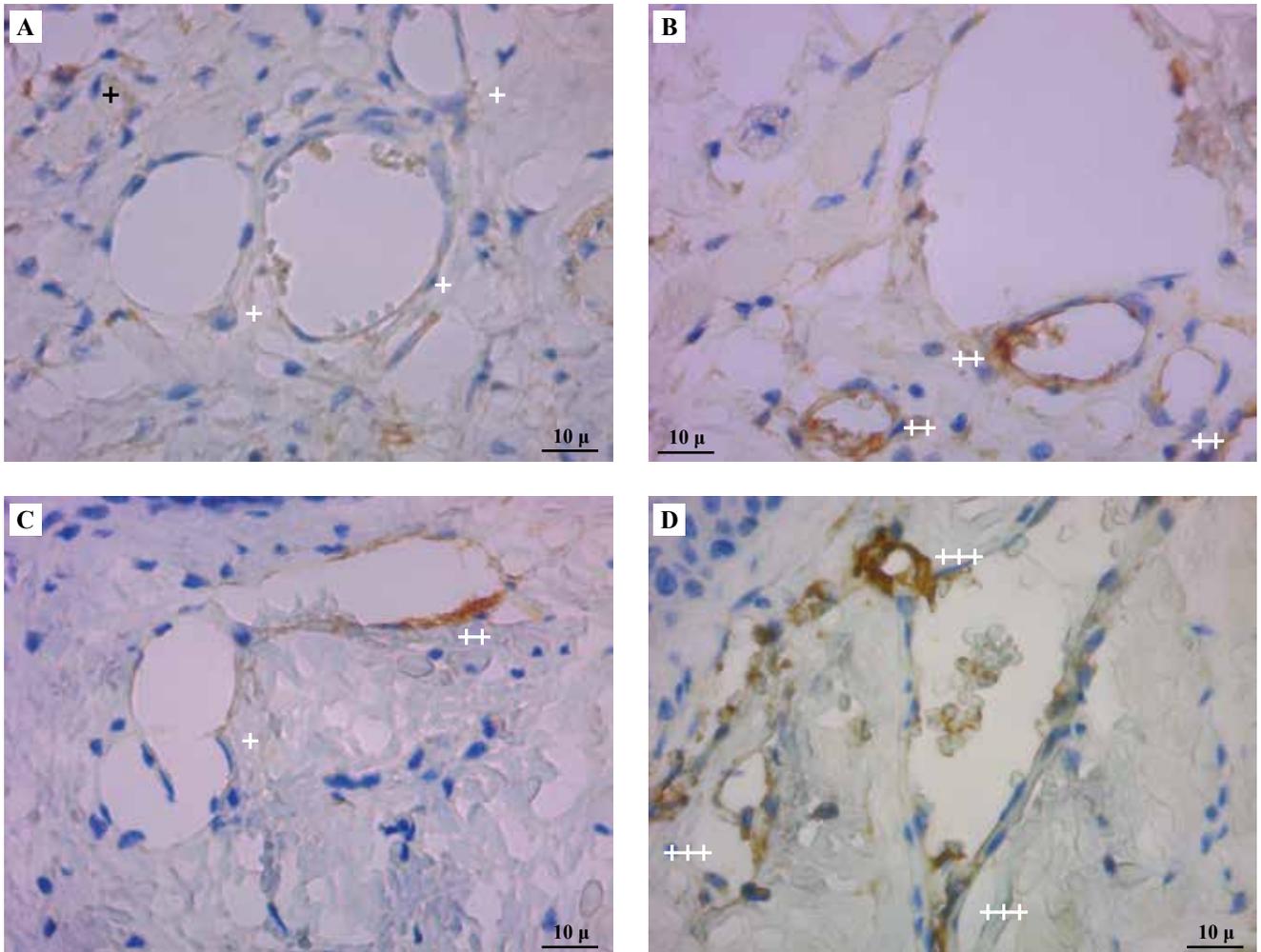


Рис. 2. Реакция на VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином.

А – картина, характерная для 2-й и 4-й групп. 2-я группа. 7-е сутки. В – 3-я группа. 7-е сутки.

С – 2-я группа. 12-е сутки. D – картина, характерная для 3-й и 4-й групп. 3-я группа. 12-е сутки.

+ – слабое окрашивание, ++ – умеренное окрашивание, +++ – сильное окрашивание, отражающие степень экспрессии VEGF, $\times 900$

Fig. 2. Reaction to VEGF in endothelial cells of granulation tissue, staining of nuclei with hematoxylin.

A – picture characteristic of groups 2 and 4. Group 2. Day 7. B – group 3. Day 7. C – group 2. Day 12.

D – picture characteristic of groups 3 and 4. Group 3. Day 12.

+ – weak staining, ++ – moderate staining, +++ – strong staining, reflecting the degree of VEGF expression, $\times 900$

интактных крыс в отличие от животных других экспериментальных групп, что свидетельствовало о более высокой микроциркуляции и, как следствие, лучшем кровоснабжении регенерируемой поверхности у крыс 3-й группы.

Патологические изменения в виде тромбоза и сладжа вызывают отежные явления в межклеточном пространстве и выраженный ацидоз, приводят к гипоксии тканей, которая на начальных этапах необходима для активации неоангиогенеза [15]. Основную роль в регуляции процессов пролиферации эндотелиоцитов и активации физиологического и патологического ангиогенеза играет VEGF [16]. Он экспрессируется как эндотелиоцитами, так и клетками воспалительной инфильтрации, особенно макрофагами [17].

Анализ экспрессии VEGF на 7-е сутки выявил слабopоложительную реакцию у животных 2-й и 4-й групп и умеренную у животных 3-й группы, а на 12-е сутки умеренную у животных в группе без коррекции и сильноположительную у крыс в группах с коррекцией п-тирозолом и лидокаином + экстракт ромашки аптечной. Следовательно, неоангиогенез более интенсивно протекал в группах с лечением, в частности п-тирозолом.

Выявленные на 3-и, 7-е и 12-е сутки наименьшие показатели плотности измененных сосудов, восстановление косвенных показателей гемодинамики, таких как ЗПкД и ИК, и положительная реакция на VEGF на 7-е и 12-е сутки у животных с коррекцией п-тирозолом, вероятно, объясняются его антиоксидантными свойствами.

Заключение

Выявлено, что использование п-тирозола на фоне экспериментального стоматита положительно влияет на сосудистый компонент слизистой оболочки, что проявляется в усилении кровоснабжения поврежденной области за счет увеличения плотности неизменных микрососудов, снижения плотности сосудов со сладжем, стазом и тромбозом и усиления неангиогенеза, отражением которого являлось увеличение экспрессии VEGF.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Ю. Варакута, Н.Н. Байтингер, С.В. Логвинов, М.Б. Плотников.
Сбор и обработка материала – А.Д. Коняева, Н.Н. Байтингер.
Написание текста – А.Д. Коняева, Н.Н. Байтингер.
Редактирование – Е.Ю. Варакута, Л.Р. Мустафина, С.В. Логвинов, А.В. Герасимов, А.В. Потапов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.Yu. Varakuta, N.N. Baitinger, S.V. Logvinov, M.B. Plotnikov.
Collected the data and performed the analysis – A.D. Koniaeva, N.N. Baitinger.
Wrote the paper – A.D. Koniaeva, N.N. Baitinger.
Edited the manuscript – E.Yu. Varakuta, L.R. Mustafina, S.V. Logvinov, A.V. Gerasimov, A.V. Potapov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Sardaro N, Della Vella F, Incalza MA, DI Stasio D, Lucchese A, Contaldo M et al.* Oxidative stress and oral mucosal diseases: an overview. *In Vivo.* 2019;33(2):289–96. DOI: 10.21873/in-vivo.11474.
2. *Değer AN, Özyiğit F, Koçak FE, Bayhan Z, Zeren S, Arık Ö et al.* Corrective effect of verbascoside on histomorphological differences and oxidative stress in colon mucosa of rats in which colon ischemia-reperfusion injury was induced. *Turk J Gastroenterol.* 2021;32(7):548–9. DOI: 10.5152/tjg.2021.19747.
3. *Alkadi H.* A review on free radicals and antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 2020;20(1):16–26. DOI: 10.2174/1871526518666180628124323.
4. *Sun L, Zhou R, Sui J, Liu Y.* Simultaneous preparation of salidroside and p-tyrosol from *Rhodiola crenulata* by DIAION HP-20 macroporous resin chromatography combined with silica gel chromatography. *Molecules.* 2018;23(7):1602. DOI: 10.3390/molecules23071602.
5. *Chernysheva GA, Smolyakova VI, Osipenko AN, Plotnikova TM, Plotnikov MB.* Effect of p-tyrosol on the process of left-ventricular remodeling in the long period after myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med.* 2022;173(1):17–20. DOI: 10.1007/s10517-022-05483-6.
6. *Huang S, Hu Z, Wang P, Zhang Y, Cao X, Dong Y et al.* Rat epidermal stem cells promote the angiogenesis of full-thickness wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):344. DOI: 10.1186/s13287-020-01844-y.
7. *Pu WL, Zhang MY, Bai RY, Sun LK, Li WH, Yu YL et al.* Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: a review. *Biomed Pharmacother.* 2020;121:109552. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109552.
8. *Irawan C, Nufus H, Rachmadi L, Harimurti K, Munandar A, Yunus RE.* The relationship of vascular endothelial growth factor and osteopontin expression with 3-year progression-free survival of locally advanced nasopharyngeal cancer patients treated with platinum-based chemoradiation. *Contemp Oncol (Pozn).* 2022;26(3):220–8. DOI: 10.5114/wo.2022.120698.
9. *Ertugrul B, Akgun B, Artas G, Erol FS, Demir F.* Evaluation of BMP-2, VEGF, and vitamin D receptor levels in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Turk Neurosurg.* 2022;32(1):91–6. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.33552-20.2.
10. *Plotnikov MB, Plotnikova TM.* Tyrosol as a neuroprotector: strong effects of a “weak” antioxidant. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(4):434–48. DOI: 10.2174/1570159X18666200507082311.
11. *Байтингер Н.Н., Варакута Е.Ю., Мустафина Л.Р., Коняева А.Д., Логвинов С.В., Плотников М.Б. и др.* Эффективность применения п-тирозола для стимулирования регенерации слизистой оболочки губы при экспериментальном стоматите. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017;16(3):16–24. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-16-24.
Baitinger NN, Varakuta EYu, Mustafina LR, Koniaeva AD, Logvinov SV, Plotnikov MB et al. Efficacy of p-tyrosol medication for regeneration stimulation of lip mucous membrane at experimental stomatitis. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017;16(3):16–24 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-16-24.
12. *Байтингер Н.Н., Варакута Е.Ю., Мустафина Л.Р., Коняева А.Д.* Морфологические изменения сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки губы при экспериментальном стоматите. *Морфология.* 2018;153(3):31. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35593174> (получено 11.05.2023).
Baitinger NN, Varakuta YeYu, Mustafina LR, Koniaeva AD. Morphological changes in the vessels of the microcirculatory bed of the lip mucous membrane in rats with experimental stomatitis. *Morphology.* 2018;153(3):31 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35593174> (accessed 11.05.2023).
13. *Соболева М.Ю.* Морфофункциональные особенности восстановления целостности кожи при термической травме. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2019;8(1):71–77. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-71-77.
Soboleva MYu. Morphofunctional features of the restoration of the integrity of the skin after thermal injury. *Clinical and experimental morphology.* 2019;8(1):71–77 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-71-77.
14. *Байтингер Н.Н., Варакута Е.Ю., Мустафина Л.Р., Коняева А.Д.* Изменения слизистой оболочки губы у крыс при экспериментальном стоматите под влиянием п-тирозола. *Морфология.* 2017;151(3):57. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=yepfkv> (получено 11.05.2023).
Baitinger NN, Varakuta YeYu, Mustafina LR, Koniaeva AD. Changes in lip mucous membrane in rats with experimental

- stomatitis treated with p-tyrosol. *Morphology*. 2017;151(3):57 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=yepfkw> (accessed 11.05.2023).
15. *Vempati P, Popel AS, MacGabhann F*. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(1):1–19. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.11.002.
 16. *Иванов И.А., Асатурова А.В., Чернуха Г.Е., Думановская М.Р., Мнихович М.В.* Роль патологического неоангиогенеза в формировании полипов эндометрия и механизмы возникновения аномальных маточных кровотечений. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(2):28–34. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-28-34.
 17. *Иванов И.А., Асатурова А.В., Чернуха Г.Е., Думановская М.Р., Мнихович М.В.* The role of pathological angiogenesis in endometrial polyp pathogenesis and abnormal uterine bleeding. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(2):28–34 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-28-34.
 17. *Шмакова Т.В., Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б.* Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(2):5–11. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-5-11.
 17. *Shmakova TV, Kananykhina EYu, Bolshakova GB*. Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(2):5–11 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-5-11.

Информация об авторах

Анастасия Денисовна Коняева – старший преподаватель кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии Сибирского государственного медицинского университета.

Наталья Николаевна Байтингер – ассистент кафедры стоматологии Сибирского государственного медицинского университета.

Елена Юрьевна Варакута – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии Сибирского государственного медицинского университета.

Лилия Рамильевна Мустафина – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета.

Сергей Валентинович Логвинов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета.

Александр Владимирович Герасимов – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета.

Алексей Валерьевич Потапов – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета.

Марк Борисович Плотников – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ.

Author information

Anastasiia D. Koniaeva – Assistant Professor, Human Anatomy Department with a course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9708-1948>

Natalia N. Baitinger – Teaching Assistant, Dentistry Department, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-9267-0519>

Elena Yu. Varakuta – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Human Anatomy Department with a course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-3173-5336>

Liliia R. Mustafina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Histology, Embryology and Cytology Department, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-3526-7875>

Sergei V. Logvinov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Histology, Embryology and Cytology Department, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9876-6957>

Alexander V. Gerasimov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Histology, Embryology and Cytology Department, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-8526-6187>

Alexey V. Potapov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Histology, Embryology and Cytology Department, Siberian State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-0468-3959>

Mark B. Plotnikov – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Circulatory Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine.

<https://orcid.org/0000-0002-0548-6586>

Реакция Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс на двухмесячное поступление водорастворимого кремния

Е.А. Григорьева¹, В.С. Гордова², В.Е. Сергеева¹, А.Т. Смородченко³

¹ ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

² ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

³ Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

Резюме. Введение. Соединения кремния широко используются в промышленном производстве, поэтому вероятность постоянного контакта человека с этим микроэлементом чрезвычайно высока. Изучение реакции макрофагов печени позволит получить новые данные об их возможном участии в воспалительном процессе, индуцированном поступающим с водой кремнием. Цель исследования – изучить реакцию Iba-1+ и CD68+ клеток печени лабораторных крыс на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в течение 2 месяцев.

Материалы и методы. Лабораторные крысы были разделены на две группы: контрольная (n=5) получала питьевую бутилированную воду *ad libitum*, опытная (n=5) – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$) в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний, что соответствовало предельно допустимой, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», действующим на момент проведения исследования. Животные были выведены из эксперимента через 2 месяца. Печень извлечена и фиксирована в 10% нейтральном формалине и залита в парафин по стандартному протоколу. Для выявления Iba1+ и CD68+ структур использовали иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный методы с применением специфических антител.

Результаты. Сравнительный анализ экспрессии двух маркеров макрофагов показал, что медиана площади Iba-1+ клеток в печени крыс опытной группы уменьшилась в 0,87 раза по сравнению с печенью крыс контрольной группы (p=0,000006). В печени крыс опытной группы возрастало количество как Iba-1+ (p=0,02), так и CD68+ клеток (p=0,01). Выявлены уменьшение интенсивности иммунофлуоресценции в Iba-1+ клетках печени крыс опытной группы (p=0,01) и увеличение ее в CD68+ клетках (p=0,27).

Заключение. Поступление водорастворимого кремния в концентрации 10 мг/л приводит к активации макрофагов печени за относительно небольшой срок воздействия (2 месяца). В связи с этим следует придать большее значение изучению вопроса безопасности соединений кремния в условиях их постоянного поступления.

Ключевые слова: кремний, водорастворимые силикаты, печень, CD68-позитивные клетки, Iba-1-позитивные клетки, макрофаги, M1-поляризованные макрофаги

Для корреспонденции: Евгения Александровна Григорьева. E-mail: shgrev@yandex.ru

Для цитирования: Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. Реакция Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс на двухмесячное поступление водорастворимого кремния. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):50–58. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.50-58.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 22.05.2023. Получена после рецензирования 05.06.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Effect of a two-month water-soluble silicon intake on Iba1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats

Е.А. Grigoreva¹, V.S. Gordova², V.E. Sergeeva¹, A.T. Smorodchenko³

¹ IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

³ Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

Abstract. Introduction. Silicon compounds are widely used in industrial production; therefore, people are highly likely to have constant contact with this element. Hepatic macrophages are crucial in maintaining homeostasis in the liver; thus, investigating their reaction can provide new information on their possible

participation in the inflammation induced by silicon supplied with water. The aim was to explore how Iba1+ and CD68+ liver cells in laboratory rats respond to the intake of silicon with drinking water at a concentration of 10 mg/l during two months.

Materials and methods. Laboratory rats were divided into 2 groups: the control group (n=5) received drinking bottled water *ad libitum*, whereas the experimental one was given the same water with addition of sodium metasilicate nonahydrate ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$) at a concentration of 10 mg/l in terms of silicon. This corresponded to the maximum allowable concentration, according to SanPiN 2.1.4.1074-01 in force at the time of the experiment. The animals were withdrawn from the experiment 2 months after had begun. The liver was removed and fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin according to the standard protocol. Iba1+ and CD68+ structures were detected with immunohistochemical and immunofluorescence methods using specific antibodies.

Results. We compared the expression patterns of the two macrophage markers and detected that in the experimental group, the median area of Iba1-positive cells in the livers of rats had a 0.87-time decrease compared to that in the control group ($p=0.000006$). The experimental group showed an increase in the number of Iba1+ and CD68+ cells ($p=0.02$ and $p=0.01$, respectively). We revealed that in the experimental group, immunofluorescence in Iba1+ liver macrophages decreased ($p=0.01$), whereas that in CD68+ macrophages increased ($p=0.27$).

Conclusion. The intake of water-soluble silicon at a concentration of 10 mg/l activates liver macrophages in a relatively short period of exposure (two months). Therefore, the safety of silicon compounds in the conditions of their constant supply should be studied more thoroughly.

Keywords: silicon, water-soluble silicates, liver, CD68-positive cells, IBA1-positive cells, macrophages, M1-polarized macrophages

Corresponding author: Evgeniia A. Grigoreva. E-mail: shgrev@yandex.ru

For citation: Grigoreva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T. Effect of a two-month water-soluble silicon intake on Iba-1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(1):50–58 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.50-58.

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

Received 22.05.2023. Received in revised form 05.06.2023. Accepted 20.06.2023.

Введение

Кремний является вторым по распространенности микроэлементом в природе. Среднесуточная доза кремния, поступающего в организм человека, варьирует от 10–24 до 140–204 мг в сутки и зависит от рациона питания и региона проживания. В настоящее время различные соединения кремния активно используются в косметическом, пищевом и фармацевтическом производстве. Следовательно, человек получает кремний не только в составе воды и пищевых продуктов, таких как злаковые, овощи, морепродукты, но и в составе пищевых добавок, лекарственных препаратов и других веществ [1].

Кремний, поступающий в организм человека в составе разных его соединений, под воздействием соляной кислоты желудка способен расщепляться до биодоступной формы – ортокремниевой кислоты. Последняя обладает свойством диффундировать через мембраны эпителия слизистой оболочки кишечника и попадать в кровотоки [2].

Макрофаги – многочисленная группа клеток, отличающихся друг от друга по онтогенезу, морфологии, распределению в тканях и функциям, трансформирующихся с дифференцированием в различные фенотипы, необходимые для иммунного ответа. Они играют важную роль в патогенезе многих заболеваний печени. Резидентными макрофагами печени являются клетки Купфера. В ответ на воздействие разных про-

воцирующих воспалению факторов макрофаги печени активируются, высвобождают цитокины и хемокины и привлекают циркулирующие в крови моноциты. В результате этого происходит либо усугубление симптомов того или иного заболевания, либо, наоборот, активация репарации [3–5].

Изучение роли макрофагов в воспалении позволило разделить их на две противоположные по функциям популяции – M1 и M2, где M1-поляризованные макрофаги реализуют цитотоксичность, поддерживая воспаление, а M2-поляризованные ответственны за процессы репарации [6, 7]. Фенотипически M1-поляризованные макрофаги экспрессируют MHC II класса, CD68, CD80, CD86 [8]. В то же время Iba-1-позитивные клетки могут менять поляризацию с M1 на M2 [9].

Антитело к белку Iba-1, относящемуся к кальций-связывающим пептидам, обычно используется для идентификации клеток микроглии в тканях головного мозга. Тем не менее Iba-1-позитивные клетки выявляются и в других тканях и органах, например в печени. При этом они, как правило, участвуют в процессах воспаления, миграции клеток, пролиферации и передачи сигнала посредством продукции цитокинов. Экспрессия Iba-1 и CD68 в разных клетках может отличаться. Белок Iba-1 обнаруживается на поверхности всех клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, в том числе макрофагов, которые экспрессируют на своей поверхности CD163, CD16 и CD68. Известно, что средние

размеры Iba-1-позитивных клеток печени могут уменьшаться при воспалительных процессах этого паренхиматозного органа, в том числе их морфология коррелирует со стадиями фиброза печени. В то же время CD68 экспрессируется преимущественно только на поверхности активированных макрофагов [4, 10, 11]. Маркер CD68 – представитель семейства скавенджер-рецепторов, следовательно, его экспрессия повышается на макрофагах, отвечающих за воспалительные стимулы [6].

В исследованиях H.L. Herd et al. выявлено, что наибольшее поглощение наночастиц кремнезема наблюдалось клетками печени, относящимися к M1-поляризованным макрофагам [12]. Эксперимент с внутрибрюшным введением мезопористых наночастиц кремнезема (50 мг/кг) показал, что активированные клетки Купфера печени способны высвобождать цитокины (IL-1 β , TNF- α), приводящие к развитию воспалительного процесса и образованию силикотических узелков в печени, подобно механизму развития силикоза легких [13].

Наши ранние гистологические исследования, связанные с изучением реакции CD68+ клеток печени лабораторных крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение 9 месяцев, показали, что хроническое поступление этого микроэлемента приводит к увеличению количества данных клеток в поле зрения, уменьшению площади макрофагов за счет роста доли клеток малого размера, а также повышению экспрессии CD68 на их поверхности [2].

Цель исследования – изучить реакцию Iba-1- и CD68-позитивных клеток печени лабораторных крыс на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в течение 2 месяцев.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на лабораторных нелинейных крысах – самцах 3-месячного возраста, содержащихся в обычных условиях вивария при естественном освещении. Крысы были разделены на группы – контрольную (n=5) и опытную (n=5). Первые получали питьевую бутилированную воду *ad libitum* в течение 2 месяцев, вторые – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в перерасчете на кремний. Данная концентрация кремния в питьевой воде соответствовала предельно допустимой, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01, действующим на момент эксперимента. Исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 3 от 12.11.2021).

Через 2 месяца крысы были выведены из эксперимента путем цервикальной дислокации, после чего извлекалась печень, которую в дальнейшем фиксиро-

вали в 10% нейтральном формалине, обезживали и заливали в парафин по стандартной методике [2]. Для выявления Iba1+ и CD68+ структур использовали иммуногистохимический метод и непрямой иммунофлуоресцентный метод с применением специфических антител (АТ): первичные (кроличьи АТ против белка Iba-1 (1:500, Wako, Япония) и мышьиные АТ против белка CD68 (1:500, Abcam, Великобритания); вторичные (биотилинированные АТ (1:500, goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG, Vector Laboratories, США) и АТ с флуоресцентной меткой (1:500, goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa 594, goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa 488, Thermo Fischer Scientific, КНР). Парафиновые срезы толщиной 6 мкм приготовлены с помощью микротомы Leica SM2010 (Leica Biosystems, Германия) и депарафинированы. Демаскирование антигена проводили путем кипячения срезов в 1% цитратном буфере в течение 10 минут с последующим охлаждением их до комнатной температуры. Эндогенную пероксидазную активность подавляли в 3% растворе перекиси водорода в течение 30 минут. После этого препараты трехкратно промывали в 0,1 М фосфатном буфере. Блокирование неспецифического связывания АТ осуществляли с помощью инкубации срезов в течение 60 минут с 10% козьей сывороткой при комнатной температуре. Для иммуногистохимического окрашивания инкубацию с первичными АТ проводили в течение 18 часов при +4°C, со вторичными АТ – 60 минут при комнатной температуре. Потом срезы обрабатывали авидин-пероксидазным комплексом (ABC Standard, Vector Laboratories, США). Далее проводили инкубацию с 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлоридом (Sigma-Aldrich, США), придававшим детектирующимся структурам темно-коричневый цвет. Для непрямого иммунофлуоресцентного анализа срезы были инкубированы с теми же первичными АТ, но в качестве вторичных использовались АТ с флуоресцентной меткой (60 минут при комнатной температуре). После очередного трехкратного промывания в 0,1 М фосфатном буфере срезы были покрыты покровным стеклом и хранились в темноте при температуре +4°C до микроскопического исследования.

Флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа BX51 Olympus microscope (Olympus, Япония). Для подсчета маркированных иммуногистохимическим методом Iba-1- и CD68-позитивных клеток, измерения площади, занимаемой ими на микрофотографиях (площадь микрофотографии = 93119,06 мкм²), использовали микроскоп МИКМЕД-6 (АО «ЛОМО», Россия) при увеличении объектива $\times 40$ и цифровой камеры с программным обеспечением MU1000 (AmScore, США). Интенсивность флуоресценции измеряли с применением программы ImageJ [14, 15].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Площадь Iba-1 и CD68-позитивных клеток распределяли автоматически на десять категорий на гистограмме. Среди них выделя-

ли три наиболее многочисленные категории: малые, средние и большие макрофаги. Площадь клеток, составляющих правый хвост гистограммы, объединяли в группу очень больших макрофагов. Кроме того, для определения формы измеряемых клеток была использована методика, апробированная на ядрах клеток [16]. Базируясь на этом методе, были измерены коэффициент формы (КФ) ($KF = 4 \times \pi \times S_{\text{я}}/P_{\text{я}}^2$) и индекс контура (ИК) клетки, отражающий рельеф его поверхности ($IK = P_{\text{я}}/\sqrt{S_{\text{я}}}$, где $S_{\text{я}}$ – площадь клетки, $P_{\text{я}}$ – периметр клетки). При этом круг имеет коэффициент формы, который равняется 1, и индекс контура – 3,54.

Полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения изучаемого признака данные представляли как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде $M \pm m$. Статистическую значимость отличий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана (Me) и интерквартильный размах ($Q1; Q3$). В этом случае для определения статистической значимости использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия в обоих случаях считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Микроскопическое изучение печени крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте

в течение 2 месяцев, показало, что морфологическая картина изучаемого органа в обеих экспериментальных группах не сильно отличалась. Обращало на себя внимание некоторое расширение центральных вен печеночных долек в печени крыс опытной группы.

Iba-1+ и CD68+ клетки при иммуногистохимическом окрашивании имели разную степень интенсивности коричневой окраски и разную форму (от округлой до вытянутой с отростками). Они располагались около центральных вен печеночных долек, между печеночными балками и в области портальных трактов. При визуальном осмотре микрофотографий было отмечено, что в печени крыс опытной группы Iba-1+ клетки имели преимущественно светло-коричневую окраску, следовательно, интенсивность реакции в этих клетках по сравнению с контрольной группой была ниже. Iba-1+ клетки в сравнении с CD68+ клетками имели визуально большие размеры и были более отростчатыми (рис. 1).

Результаты морфометрии подтвердили наши визуальные наблюдения (табл. 1). Так, медиана площади Iba-1+ клеток в печени крыс опытной группы уменьшилась в 0,87 раза ($p=0,000006$), а медиана их периметра – в 0,96 раза ($p=0,08$). Распределение клеток по площади на малые, средние, большие и очень большие выявило, что среди Iba-1+ клеток наблюдается увеличение доли малых и средних, а также статистически значимое уменьшение доли больших по размеру клеток ($p=0,03$) (табл. 2). Медиана площади CD68+ клеток печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной

Таблица 1 | Table 1

Сравнение количественных и качественных характеристик Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс | Comparison of quantitative and qualitative characteristics of Iba1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats

Параметры Parameters	Iba-1+ макрофаги Iba1+ macrophages		CD68+ макрофаги CD68+ macrophages	
	контрольная группа control group	опытная группа experimental group	контрольная группа control group	опытная группа experimental group
Площадь макрофагов, мкм ² Area of macrophages, μm ²	43,44 (26,61; 69,83)	37,87 (23,33; 58,95)*	29,95 (17,69; 47,30)	29,85 (18,23; 48,36)
Периметр макрофагов, мкм Perimeter of macrophages, μm	28,61 (20,21; 41,01)	27,50 (19,65; 38,43)*	22,88 (15,44; 31,69)	21,87 (15,75; 29,89)
Площадь, занимаемая макрофагами, относительно площади микрофотографии, % Area occupied by macrophages relative to the area of photographs, %	1,23 (0,94; 1,95)	1,43 (1,23; 1,90)	1,01 (0,90; 1,18)	1,25 (0,95; 1,85)*
Индекс контура клетки Cellular contour index	4,34 (3,93; 4,89)	4,48 (4,07; 5,00)*	4,19 (3,68; 4,59)	3,99 (3,67; 4,30)*
Коэффициент формы клетки Cellular form	0,66 (0,52; 0,81)	0,63 (0,50; 0,75)*	0,71 (0,59; 0,92)	0,79 (0,31; 1,31)*

* статистически значимые различия $p < 0,05$

* significant differences at $p < 0.05$

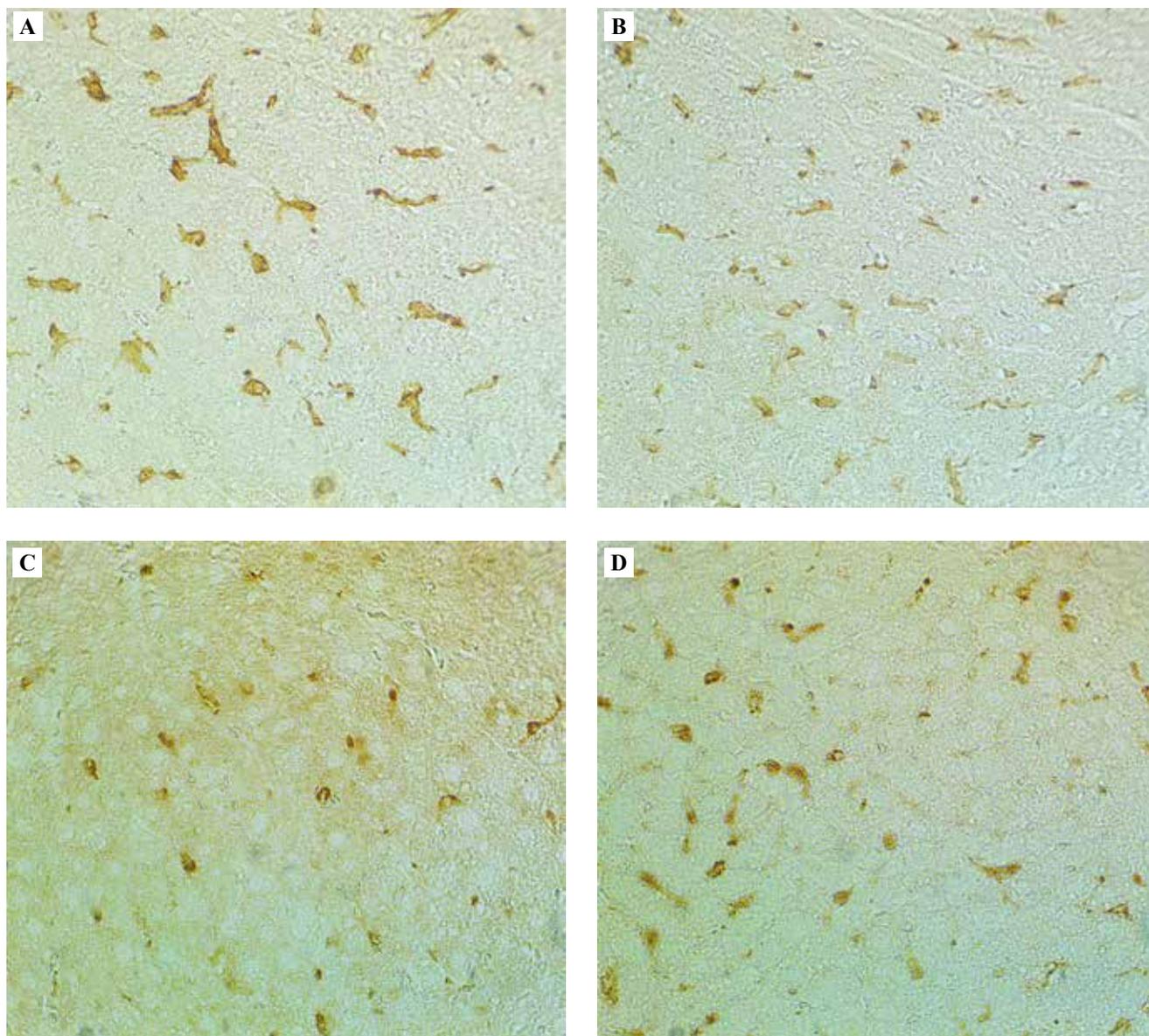


Рис. 1. Iba-1+ и CD68+ клетки печени лабораторных крыс, выявленные иммуногистохимическим методом, $\times 400$.

А, В – Iba-1+ клетки печени крыс, С, D – CD68+ клетки печени крыс. А, С – печень крыс контрольной группы, В, D – печень крыс опытной группы

Fig. 1. Iba-1+ and CD68+ rat liver cells detected by immunohistochemistry, $\times 400$.

А, В – Iba-1+ rat liver cells, С, D – CD68+ rat liver cells. А, С – livers of the rats from the control group, В, D – livers of the rats from the experimental group

ной практически не изменялась ($p=0,63$). Отмечено небольшое увеличение доли макрофагов очень больших размеров. Уменьшалось значение медианы периметра клеток в 0,95 раза ($p=0,10$). При определении коэффициента формы и индекса контура клеток выявлено, что CD68+ макрофаги крыс опытной группы имели наиболее приближенные показатели к значениям идеального круга.

Среднее количество Iba-1+ и CD68+ клеток печени крыс на микрофотографию составило $26,38 \pm 0,62$ и $26,53 \pm 1,75$ для контрольной группы, $34,24 \pm 2,59$

и $32,87 \pm 1,64$ для опытной. Следовательно, наблюдалось возрастание Iba-1+ клеток в 1,29 раза ($p=0,02$), CD68+ клеток в 1,32 раза ($p=0,01$) в печени крыс опытной группы. Медиана площади, занимаемой Iba-1+ и CD68+ макрофагами, относительно площади микрофотографии увеличивалась в 1,16 ($p=0,38$) и 1,23 ($p=0,01$) раза, соответственно.

С помощью программы ImageJ была замерена интенсивность иммунофлуоресценции каждой Iba-1+ и CD68+ клетки отдельно. Выявлено уменьшение интенсивности иммунофлуоресценции в Iba-1+ клетках

(красная флуоресценция) печени крыс опытной группы в 0,89 раза ($p=0,01$) и увеличение ее в CD68+ структурах (зеленая флуоресценция) в 1,05 раза ($p=0,27$). Полученные данные были представлены в виде графиков, построенных с использованием плагина Graphics RGB Profile Plot программы ImageJ по микрофотографиям препарата печени крыс контрольной и опытной групп с одновременной реакцией на Iba-1 и CD68 (рис. 2).

Обсуждение

При сравнении наших предыдущих результатов [2], полученных при изучении реакции CD68+ клеток печени лабораторных крыс в эксперименте с поступлением кремния в течение 9 месяцев, были выявлены некоторые схожие реакции, а именно увеличение количества CD68+ клеток в поле зрения у крыс опытной группы. Площадь CD68+ клеток печени крыс, находившихся в эксперименте в течение 9 месяцев, была несколько больше, чем у крыс, находившихся в эксперименте 2 месяца. Мы предполагаем, что данные различия отчасти связаны как с возрастными особенностями животных, так и с длительностью воздействия водорастворимого кремния. Например, в исследованиях макрофагов перитонеальной жидкости мышей разных возрастных групп выявлены увеличение содержания липофусцина с возрастом и усиление окислительных процессов в организме животных, в которых фагоциты играют ключевую роль, способствуя иммуностарению [17].

Известно, что макрофаги, экспрессирующие Iba-1, способны также экспрессировать CD68 [11]. Наши результаты показывают, что медиана последних входит в состав доли Iba-1+ макрофагов малых размеров, а квартильный размах (Q1; Q3) – в долю малых и средних по размеру. Это же подтверждает коэкспрессия красной (Iba-1) и зеленой (CD68) флуоресценции в одних и тех же клетках (рис. 2 А, В). Увеличение среднего количества Iba-1+ и CD68+ клеток в печени крыс опытной группы, скорее всего, происходит за счет привлечения из циркулирующей крови моноцитов, что вполне объясняет также увеличение доли Iba-1+ клеток малого размера и уменьшение их медианы площади. Графики интенсивности флуоресценции Iba-1+ и CD68+ структур печени крыс (рис. 2 С, D) наглядно показывают усиление интенсивности флуоресценции CD68 и уменьшение интенсивности флуоресценции Iba-1 в печени крыс опытной группы. Возможно, что некоторые макрофаги с коэкспрессией из-за развивающегося воспалительного процесса в печени в большей степени экспрессируют маркер CD68 на своей поверхности, перекрывающий флуоресценцию Iba-1. Известно, что наночастицы кремнезема могут вызывать активацию клеток Купфера и способствовать высвобождению ими воспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β) [13]. Наблюдаемые изменения, в целом, подтверждают наши предположения об активации CD68+ макрофагов, которые, в свою очередь, способны индуцировать воспалительный процесс. Исходя из сведений о том, что Iba-1+ клетки могут менять свою поляризацию и могут быть

Таблица 2 | Table 2

Распределение популяций Iba1+ и CD68+ макрофагов по размеру клеток, % |
Distribution of Iba1+ and CD68+ macrophage populations by cell size, %

Размеры макрофагов Macrophage sizes	Площадь, мкм ² Area, μm^2	Доля Iba-1+ макрофагов Proportion of Iba1+ macrophages		Площадь, мкм ² Area, μm^2	Доля CD68+ макрофагов Proportion of CD68+ macrophages	
		контрольная группа, % control group, %	опытная группа, % experimental group, %		контрольная группа, % control group, %	опытная группа, % experimental group, %
Малые макрофаги Small macrophages	4,45–35,46	39	47	1,85–19,79	30	28
Средние макрофаги Medium macrophages	35,46–66,48	33	36	19,79–37,73	33	35
Большие макрофаги Large macrophages	66,48–97,49	17	11*	37,63–55,67	20	18
Очень большие макрофаги Very large macrophages	>97,49	11	6	>55,67	17	19

* статистически значимое различие между контрольной и опытной группами $p=0,03$

* significant differences between the control and experimental groups at $p=0.03$

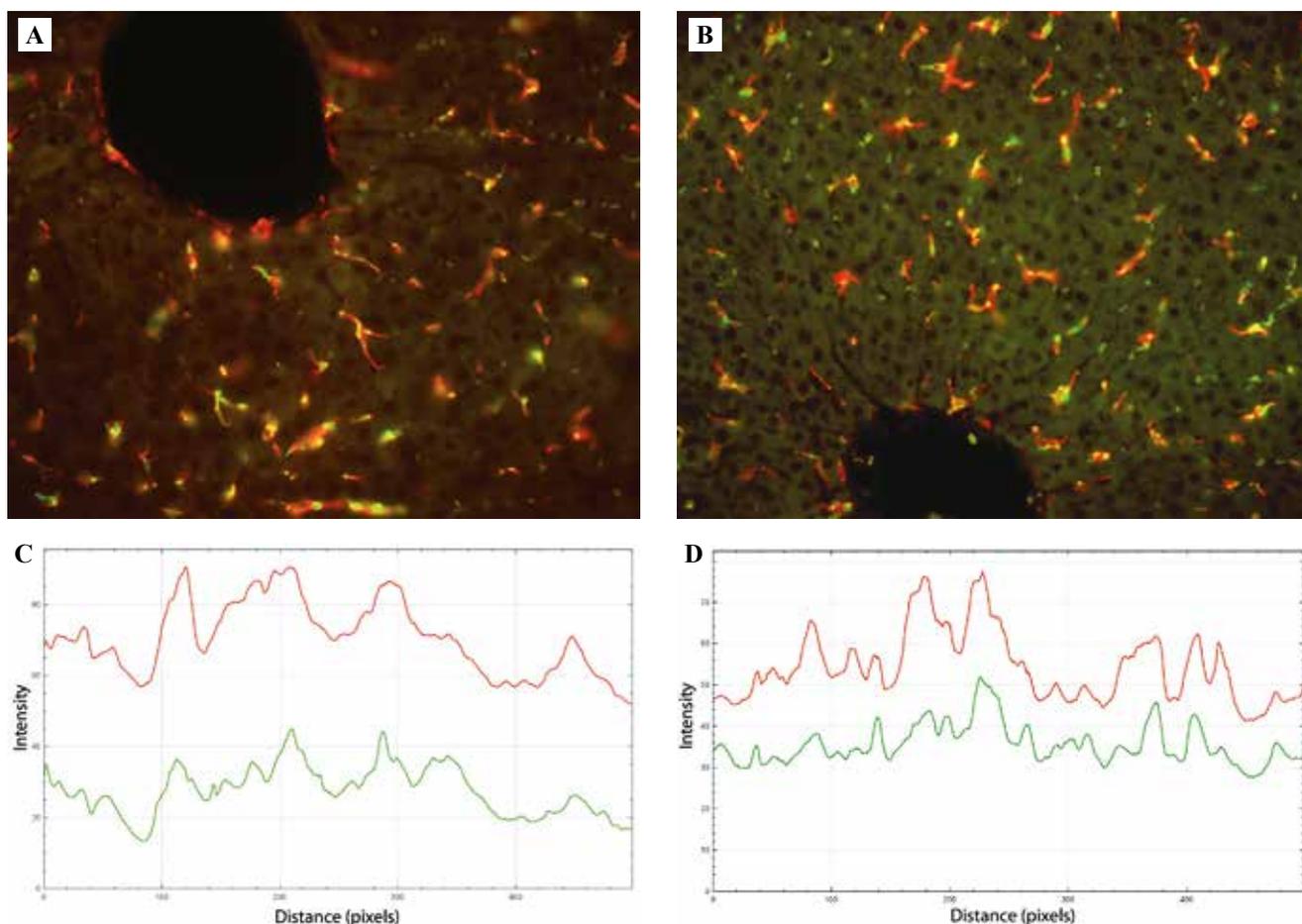


Рис. 2. А, В – иммунофлуоресценция Iba-1+ и CD68+ клеток печени крыс. $\times 400$. Iba-1 – красная флуоресценция; CD68 – зеленая флуоресценция. С, D – графики интенсивности флуоресценции Iba-1+ и CD68+. Красная линия графика отображает интенсивность иммунофлуоресценции Iba-1+ клеток, зеленая линия – CD68+ клеток.

А, С – печень крыс контрольной группы. В, D – печень крыс опытной группы

Fig. 2. А, В – immunofluorescence of Iba1+ and CD68+ rat liver cells. $\times 400$. Iba1 – red fluorescence; CD68 – green fluorescence. С, D – fluorescence intensity plots for Iba1+ and CD68+. The intensity of immunofluorescence of Iba1+ cells (red line), CD68+ cells (green line).

А, С – livers of the rats from the control group. В, D – livers of the rats from the experimental group

как M1-поляризованными, так и M2-поляризованными макрофагами [9], вполне вероятно, что Iba-1+ клетки, не экспрессирующие CD68, участвуют в процессах репарации печени или также поддерживают воспалительный процесс, но уже в коэкспрессии с другим маркером [18].

Заключение

Поступление кремния с питьевой водой в течение 2 месяцев в концентрации 10 мг/л приводит к увеличению количества Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс и уменьшению площади Iba-1+ макрофагов за счет увеличения доли малых макрофагов; вызывает изменение интенсивности иммунофлуоресценции Iba-1+ и CD68+ клеток в сторону уменьшения реакции на Iba-1 и, напротив, увеличение реакции на CD68. Обнаруженные нами изменения свидетельствуют о том, что водорастворимый кремний приводит к ак-

тивации макрофагов, а значит, и иммунной системы даже при относительно небольшом сроке (2 месяца) воздействия. Следовательно, водорастворимые формы кремния, так же, как и наночастицы кремнезема, могут оказывать провоспалительное действие.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Григорьева, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева.

Сбор и обработка материала – Е.А. Григорьева, А.Т. Смородченко.

Написание текста – Е.А. Григорьева.

Редактирование – В.С. Гордова, В.Е. Сергеева, А.Т. Смородченко.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Grigoreva, V.S. Gordova, V.E. Sergeeva.

Collected the data and performed the analysis – Е.А. Grigoreva, А.Т. Smorodchenko.

Wrote the paper – Е.А. Grigoreva.

Edited the manuscript – V.S. Gordova, V.E. Sergeeva, А.Т. Smorodchenko.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературными данными). *Acta Medica Eurasica*. 2022;4:108–120. DOI: 10.47026/2413-4864-2022-4-108-120.
Grigoreva EA, Gordova VS, Sergeeva VE. The effect of silicon nanoparticles and water-soluble silicates on the liver (comparison of our own research results with literature data). *Acta Medica Eurasica*. 2022;4:108–120 (In Russ.). DOI: 10.47026/2413-4864-2022-4-108-120.
2. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. Реакция CD68-позитивных клеток печени и селезенки крыс на поступление кремния с питьевой водой. *Acta Medica Eurasica*. 2021;2:34–43. DOI: 10.47026/2413-4864-2021-2-34-43.
Grigoreva EA, Gordova VS, Sergeeva VE, Smorodchenko AT. Reaction of CD68-positive rat liver and spleen cells on silicon intake with drinking water. *Acta Medica Eurasica*. 2021;2:34–43 (In Russ.). DOI: 10.47026/2413-4864-2021-2-34-43.
3. Colino CI, Lanao JM, Gutierrez-Millan C. Targeting of hepatic macrophages by therapeutic nanoparticles. *Front Immunol*. 2020;11:218. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00218.
4. Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. Histopathological analysis of rat hepatotoxicity based on macrophage functions: in particular, an analysis for thioacetamide-induced hepatic lesions. *Food Saf (Tokyo)*. 2016;4(3):61–73. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016012.
5. Джалилова Д.Ш., Косырева А.М., Диатроптов М.Е., Макарова М.А., Макарова О.В. Морфология печени и легких и фагоцитарная активность клеток периферической крови при системной воспалительной реакции у самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Клиническая и экспериментальная морфология. 2019;8(1):47–55. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55.
Dzhalilova DSh, Kosyreva AM, Diatroptov ME, Makarova MA, Makarova OV. Liver and lung morphology and phagocytic activity of peripheral blood cells during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(1):47–55 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55.
6. Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y et al. Macrophage polarization and its role in liver disease. *Front Immunol*. 2021;12:803037. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803037.
7. Федоров А.А., Ермак Н.А., Геращенко Т.С., Топольницкий Е.Б., Шефер Н.А., Родионов Е.О. и др. Поляризация макрофагов: механизмы, маркеры и факторы индукции. Сибирский онкологический журнал. 2022;21(4):124–136. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-124-136.
Fedorov AA, Ermak NA, Gerashchenko TS, Topolnitskiy EB, Shefer NA, Rodionov EO et al. Polarization of macrophages: mechanisms, markers and factors of induction. *Siberian Journal of Oncology*. 2022;21(4):124–136 (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-124-136.
8. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing macrophages in vitro. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:119–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-7837-3_12.
9. Chen H, Feng Z, Min L, Deng W, Tan M, Hong J et al. Vagus nerve stimulation reduces neuroinflammation through microglia polarization regulation to improve functional recovery after spinal cord injury. *Front Neurosci*. 2022;16:813472. DOI: 10.3389/fnins.2022.813472.
10. Stankov A, Belakaposka-Srpanova V, Bitoljanu N, Cakar L, Cakar Z, Rosoklija G. Visualisation of microglia with the use of immunohistochemical double staining method for CD-68 and Iba-1 of cerebral tissue samples in cases of brain contusions. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2015;36(2):141–5. DOI: 10.1515/prilozi-2015-0062.
11. Guillot A, Winkler M, Silva Afonso M, Aggarwal A, Lopez D, Berger H et al. Mapping the hepatic immune landscape identifies monocytic macrophages as key drivers of steatohepatitis and cholangiopathy progression. *Hepatology*. 2023;78(1):150–66. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000270.
12. Herd HL, Bartlett KT, Gustafson JA, McGill LD, Ghandehari H. Macrophage silica nanoparticle response is phenotypically dependent. *Biomaterials*. 2015;53:574–82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.070.
13. Liu T, Li L, Fu C, Liu H, Chen D, Tang F. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33(7):2399–407. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.008.
14. Абдрахимова Й.Р., Абдрахимов Ф.А. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (Часть 2): Учебно-методическое пособие. Казань: Альянс, 2019. 26 с. Доступно по адресу: https://kpfu.ru/staff_files/F97244520/Abdrakhimova_Abdrakhimov_2.pdf (получено 17.05.2023).
Abdrakhimova YR, Abdrakhimov FA. Cell bioimaging: analysis of fluorescent images of mitochondria using ImageJ (Part 2): Study guide. Kazan: Alyans, 2019. 26 p. (In Russ.). Available from: https://kpfu.ru/staff_files/F97244520/Abdrakhimova_Abdrakhimov_2.pdf (accessed 17.05.2023).
15. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(3):378–81. DOI: 10.1002/ar.22641.
16. Smitha T, Sharada P, Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15(1):26–33. DOI: 10.4103/0973-029X.80034.
17. Vida C, de Toda IM, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol*. 2017;12:423–37. DOI: 10.1016/j.redox.2017.03.005.
18. Kenkhuis B, Somarakis A, Kleindouwel LRT, van Roon-Mom WMC, Höllt T, van der Weerd L. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2022;167:105684. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105684.

Информация об авторах

Евгения Александровна Григорьева – аспирантка кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Валентина Сергеевна Гордова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины медицинского института Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта.

Валентина Ефремовна Сергеева – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Алина Тихоновна Смородченко – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии Медицинской школы Берлина – Университета здоровья и медицины.

Author information

Evgeniia A. Grigoreva – Post-Graduate Student, Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

<https://orcid.org/0000-0003-3626-2750>

Valentina S. Gordova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Fundamental Medicine of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University.

<https://orcid.org/0000-0001-5109-9862>

Valentina E. Sergeeva – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

<https://orcid.org/0000-0003-3471-5226>

Alina T. Smorodchenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Anatomy Department, Medical School Berlin – University of Health and Medicine.

<https://orcid.org/0000-0003-1415-1531>

Гиперплазия эндометрия: патогенетические лечебные подходы (экспериментальное исследование)

Н.И. Волоцкая¹, Т.П. Макалиш¹, Г.И. Подгорный², М.А. Кальфа¹,
Н.С. Прасолов¹, А.В. Кубышкин¹, Е.П. Коваленко¹, Е.Ю. Зяблицкая¹

¹ Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Россия

² ГБУ РО «Городская больница № 6» в г. Ростове-на-Дону, Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. *Введение.* Высокая частота встречаемости гиперплазии эндометрия, удобство ее моделирования и морфологической диагностики ставят важную задачу экспериментальной медицине по разработке способов ее патогенетической коррекции. Цель работы – провести комплексное иммуноморфологическое исследование при гиперплазии эндометрия на фоне избытка эстрогенов, подобрать патогенетическую терапию и оценить ее эффективность.

Материалы и методы. В исследовании использовали лабораторных крыс Вистар (n=45), которых разделили на контрольную (n=5) и экспериментальную (n=40) группы. Нами создана и морфологически верифицирована модель гиперплазии эндометрия при овариэктомии и трансдермальном введении эстрогенов. В экспериментальной группе выполнена коррекция индолом, мелоксикамом и полиоксидонием. При иммуногистохимическом изучении экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза, различных пулов иммунных клеток, фактора роста сосудов были получены данные о механизмах развития гиперплазии.

Результаты. В данной модели иммунофенотипические изменения отличаются в отделах для вынашивания (рог матки) и изгнания плода (аналог шейки матки женщины). Выявлены разнонаправленные нарушения клеточного цикла эпителиоцитов и топографии иммунокомпетентных клеток. Мелоксикам нормализует большинство данных показателей – число иммунокомпетентных клеток, кинетику клеточных популяций, индол оказывает антиэстрогенный эффект, увеличивает экспрессию рецепторов к прогестерону, а полиоксидоний менее эффективен в коррекции гиперплазии эндометрия.

Заключение. Динамика экспрессии изученных маркеров может быть рекомендована для диагностики гиперплазии, а выявленные эффекты лекарственных препаратов для комплексной патогенетической терапии.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, иммуноморфология, воспаление, диагностика, лечение
Для корреспонденции: Евгения Юрьевна Зяблицкая. E-mail: evgu79@mail.ru

Для цитирования: Волоцкая Н.И., Макалиш Т.П., Подгорный Г.И., Кальфа М.А., Прасолов Н.С., Кубышкин А.В., Коваленко Е.П., Зяблицкая Е.Ю. Гиперплазия эндометрия: патогенетические лечебные подходы (экспериментальное исследование). Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):59–68. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.1.59-68.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке программы развития Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского «Приоритет-2030» (№ 075-15-2021-1323).

Статья поступила 20.12.2022. Получена после рецензирования 07.02.2023. Принята в печать 10.04.2023.

Endometrial hyperplasia: pathogenetic therapeutic approaches (experimental study)

N.I. Volotskaya¹, T.P. Makalish¹, G.I. Podgorny², M.A. Kalfa¹,
N.S. Prasolov¹, A.V. Kubyshekin¹, E.P. Kovalenko¹, E.Yu. Zyablitskaya¹

¹ Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

² Rostov-on-Don City Hospital No. 6, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. *Introduction.* The high incidence of endometrial hyperplasia and the convenience of its modeling and morphological diagnosis pose an important task for experimental medicine to develop methods

for its pathogenetic correction. The paper aimed to conduct a comprehensive immunomorphological study for endometrial hyperplasia against the background of excessive estrogens, select pathogenetic therapy, and evaluate its effectiveness.

Materials and methods. We used laboratory Wistar rats (n=45), which were divided into the control (n=5) and experimental (n=40) groups. We created and verified a model of endometrial hyperplasia during ovariectomy and transdermal administration of estrogens. In the experimental group, the correction with indole, meloxicam, and polyoxidonium was performed. Immunohistochemical study of the expression of proliferation markers, apoptosis, various pools of immune cells, and vascular growth factor provided data on hyperplasia development mechanisms.

Results. In this model, immunophenotypic changes differ in the parts responsible for gestation (the uterine horn) and expulsion of the fetus (analogous to the human cervix). Divergent disruptions of the cell cycle of epithelial cells and the topography of immunocompetent cells were revealed. Meloxicam normalizes most of these indicators (the number of immunocompetent cells and the kinetics of cell populations); indole has an antiestrogenic effect and increases the expression of progesterone receptors; and polyoxidonium is less effective in the correction of endometrial hyperplasia.

Conclusion. The dynamics of the expression of the studied markers can be recommended for diagnosis, whereas the identified effects of drugs can be used for complex pathogenetic therapy.

Keywords: endometrial hyperplasia, immunomorphology, inflammation, diagnosis, treatment

Corresponding author: Evgenia Yu. Zyablitskaya. E-mail: evgu79@mail.ru

For citation: Volotskaya N.I., Makalish T.P., Podgorny G.I., Kalfa M.A., Prasolov N.S., Kubyshev A.V., Kovalenko E.P., Zyablitskaya E.Yu. Endometrial hyperplasia: pathogenetic therapeutic approaches (experimental study). Clin. exp. morphology. 2024;13(1):59–68. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.59-68.

Funding. The study was supported by the V.I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program “Priority-2030” (No. 075-15-2021-1323).

Received 20.12.2022. **Received in revised form** 07.02.2023. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

За несколько десятилетий частота встречаемости патологии эндометрия многократно возросла. Преимущественно это гиперплазия эндометрия (ГЭ) и реже рак [1, 2]. На наш взгляд и по мнению экспертов, есть прямая связь ГЭ с ограничением рождаемости, блокирующим фертильность и полные гормональные репродуктивные циклы женщин, а также с поступлением эстрогенов извне, избыточным весом, нездоровыми алиментарными привычками, усугубляющими гиперэстрогению, поступлением провоспалительных цитокинов, что особенно остро проявлено в стадии менопаузального перехода [3–6] и при нарушениях систем генов и кодируемых ими белков [7].

По данным, полученным в нашей клинической морфологической лаборатории и опубликованным другими авторами, атипичная ГЭ связана с хроническим воспалением и ростом экспрессии CD45 [4, 8], уходом клеток от иммунного надзора и ингибированием их программируемой гибели через FAS-рецепторы, что приводит к неконтрольной пролиферации в условиях нарушения репарации ДНК [9]. Клетки базального слоя эндометрия получают стимулы к делению [10] гиперпродукцией эстрогенов и индукцией ангиогенеза, что на фоне недостаточности прогестерона стимулирует развитие ГЭ и рака [11]. Диагноз «гиперплазия эндометрия» верифицируют морфологически при наличии разрастания эндометриальных желез, роста железисто-стромальных соотношений, высоты эпителиоцитов в железах [12]. Прогнозирование течения ГЭ проводят

на основании выраженности клинических проявлений, степени морфологических изменений, наличия ядерной атипии [13–15].

Высокая частота встречаемости ГЭ, удобство морфологической диагностики, доступность экспериментальных моделей [16], патогенетической коррекции ГЭ и профилактики развития рака явились стимулом выполнения этой работы для решения задач медицины, прежде всего амбулаторного звена.

Цель работы – провести комплексное иммуноморфологическое исследование при ГЭ на фоне избытка эстрогенов, подобрать патогенетическую терапию и оценить ее эффективность.

Материалы и методы

Исследования выполнены в центральной научно-исследовательской лаборатории и виварии Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, подтвердившего приемлемость исследований с биоэтических позиций. Содержание и использование животных соответствовали Закону РФ от 14.05.1993 № 4979-1 «О ветеринарии», Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных, Конвенции Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). На проведение исследования получено разрешение комитета по этике Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского

(протокол № 4 от 12.04.2022). Все болезненные манипуляции (оперативное вмешательство при овариэктомии и выведение из эксперимента методом декапитации) выполнены под эфирным наркозом.

Эксперимент проведен на 45 зрелых самках белых крыс линии Вистар весом 170–190 граммов, являющихся полиэстральными животными. После адаптации с контролем цикла по картине вагинальных мазков с целью гормональной стандартизации и исключения воздействия эндогенных гормонов в лютеиновую фазу у 40 крыс провели билатеральную овариэктомию с применением анестезии поясничным доступом в диэструсе. Контрольную группу составили 5 самок крыс после ложной овариэктомии (разрез без удаления яичника). Модель гиперэстрогении создали у животных с удаленными яичниками путем ежедневного введения эстрогенов через кожу живота курсом длительностью 4 недели в виде аппликации геля, содержащего эстрадиол 0,1% из расчета 1 мг на 1 кг веса. Этот способ введения безболезненный и удобен для эксперимента.

Гель наносили лопаточкой на кожу живота площадью 4 см² и втирали пальцем в виниловой перчатке. Животные не слизывали гель, он впитывался под кожу. Исходя из расчета, наносили около 0,2 мг эстрадиола, что является большой дозой, эффективной для создания модели гиперэстрогении.

Отмечен комплекс прямых морфологических и физиологических эффектов гиперэстрогении: 1) у крыс экспериментальной группы на основании цитологии вагинальных мазков со второй недели введения эстрадиола выявлена персистенция эструса, 2) при операции и выведении из эксперимента визуально толщина маточных рогов в несколько раз превосходила контрольные показатели, 3) на тканевом уровне это проявлено морфометрическими признаками увеличения соотношения площади желез к строме. На наш взгляд, эти данные подтверждают эффективность модели и являются более значимыми по сравнению с определением уровня гормонов в крови крыс.

Далее животных экспериментальной группы случайно и поровну разделили на четыре подгруппы по 10 особей в каждой, в одной из которых не выполняли лечебные мероприятия, а в трех дифференцированно проводили патогенетическую коррекцию ГЭ тремя способами: 1) нестероидным противовоспалительным препаратом избирательным ингибитором циклооксигеназы-2 (внутримышечное введение раствора мелоксикама 0,02 мг 1 раз в сутки на протяжении 7 дней); 2) иммуномодулятором азоксимера бромидом (полиоксидоний в таблетках по 0,08 мг энтерально через зонд 2 раза в сутки на протяжении 14 дней); 3) растительной биологически активной добавкой с антиэстрогенной и антиоксидантной активностью (индол форте в капсулах энтерально через зонд 1 раз в сутки на протяжении 14 дней). Препараты дозировали путем пересчета дозы человека на массу тела крысы. Таким образом,

сформированы две группы: крысы контрольной группы в фазе эструса (n=5) и экспериментальная группа ГЭ, которая включала четыре подгруппы: без терапевтической коррекции (n=10) и три подгруппы с коррекцией – мелоксикам (n=10), полиоксидоний (n=10), индол (n=10). Животных выводили из эксперимента с помощью декапитации под эфирным наркозом спустя 4 недели (4 недели – введение эстрогенов, из которых 2 последние недели – введение индола и полиоксидония, а мелоксикама – последние 7 дней).

Для гистологического исследования выполняли фиксацию, проводку, заключение в парафин. Пропитывание тканей парафином осуществляли в гистопроцессоре Logos (Milestone, Италия). Изготавливали парафиновые мультиблоки, позволяющие монтировать на стекло фрагменты тканей крыс разных групп согласно схеме расположения. Стандартизация обеспечена равной глубиной заливки, погружением идентичных участков и анализом контрольных образцов. Готовили срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по стандартным методикам.

Иммуногистохимию (ИГХ) выполняли согласно рекомендованным протоколам. Преаналитический этап проводили в соответствии с требованиями молекулярной иммунодиагностики [17]. Постановку реакции ИГХ осуществляли в полуавтоматическом иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica Microsystems, Германия) с использованием режимов демаскировки и инкубации, рекомендованных производителями антител к эстрогену (ER), прогестерону (PR), Ki-67, FAS, Bcl-2, VEGF, CD4, CD8, CD138. Протокол окрашивания включал депарафинизацию, блокировку эндогенной пероксидазы, детекцию продуктов реакции с помощью системы Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Германия). Препараты сканировали на микроскопе Aperio CS2 (Leica, Microsystems, Германия) и оценивали реакцию при помощи программного обеспечения Aperio Image Scope v.11.0.3.

Подсчитывали высоту эндометрия и эпителиальных клеток в железах, соотношение площади желез и стромы, их дилатацию и клеточную инфильтрацию. Методом ИГХ определяли экспрессию рецепторов к прогестерону и эстрогену с маркерами ER (клон 6F11 в разведении 1:100, Leica Biosystems, Германия), PR (клон 16 в разведении 1:100, Leica Biosystems, Германия), пролиферативную активность клеток эндометрия – маркером G-фазы митоза Ki67 (клон MM1 в разведении 1:50, Leica Biosystems, Германия), состояние систем апоптоза с антителами к FAS-рецептору (клон 133619 в разведении 1:200, Abcam, США) и антиапоптотическому белку Bcl-2 (клон BCL-2/100/D5 в разведении 1:200, Leica Biosystems, Германия), активность ангиогенеза с маркером VEGF (клон RB-9031-P1 в разведении 1:200, Thermo Scientific, США), а воспаления – с лимфоцитарными маркерами CD4 (клон 4B12, RTU, Leica Biosystems, Германия), CD8 (клон 4B11, RTU, Leica Biosystems, Великобритания), CD138 (клон MI15,

RTU, Leica Biosystems, Германия), CD20 (L26 в разведении 1:100, Leica Biosystems, Германия).

Оценивали интенсивность реакции при 20-кратном увеличении в 10 полях зрения отдельно в строме эндометрия и в железистых клетках в теле матки и роге. Для Vcl-2, FAS, VEGF, ER, PR, Ki67 интенсивность реакции оценивали в баллах по шкале: 0 – отсутствие, 1+ – 0–25% клеток имеют позитивное окрашивание, 2+ – 25–75% и 3+ – более 75%. Для CD4, CD8, CD20, CD138 подсчитывали количество позитивных клеток на 1 мм² среза.

Статистическую обработку данных выполнили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США) после оценки нормальности распределения признака с помощью критерия Шапиро–Уилка или t-критерия Стьюдента. Для определения различий между экспериментальной и контрольной группами применяли непараметрический метод по U-критерию Манна–Уитни. Для сравнения относительных показателей в независимых выборках применяли критерий χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса. Поскольку распределение признаков в группе отличалось от нормального, данные статистики представлены в виде медианы и первого и последнего квартилей Me (Q1; Q3). При нормальном распределении признака данные представляли как среднее значение и среднеквадратическое отклонение (M \pm SD).

Результаты

Статистически значимое увеличение железисто-стромальных соотношений (рост железистого компо-

нента при $p < 0,05$), увеличение высоты эпителиальных клеток в железах ($p < 0,001$) и высоты просветных эпителиальных клеток ($p < 0,05$) в роге матки в экспериментальной группе с моделируемой ГЭ без коррекции в сравнении с нормальным пролиферативным эндометрием верифицирует адекватность созданной модели ГЭ (табл. 1).

В аналитической части работы оценивали экспрессию рецепторов, регуляторных белков, маркеров дифференцировки лимфоцитов в доминантном правом роге матки (аналог тела матки женщины – место плацентации и вынашивания потомства у многоплодных животных) и теле матки (аналог шейки матки женщины – часть матки крысы, предназначенная для проникновения спермы и изгнания плодов). Результаты ИГХ анализа показали динамику исследованных маркеров (табл. 2).

Реакция на PR низкая во всех группах, лишь при коррекции гиперплазии индолом строма рога матки приобретает умеренно повышенную рецепторную активность. Наоборот, интенсивность реакции на рецепторы к эстрогену в роге матки достоверно снижается при моделировании ГЭ, а в теле матки крысы нет. Это можно объяснить эффективной активацией внутриклеточных систем ауторегуляции клеток-мишеней овариальных гормонов в зоне имплантации. Важно, что в группе с коррекцией мелоксикамом в аналоге шейки матки выявлено снижение числа эстрогеновых рецепторов.

Маркеры апоптоза неодинаково проявлены в тканях крыс разных групп. Интенсивность реакции к FAS в модели ГЭ высокая по сравнению с контролем во всех

Таблица 1 | Table 1

Морфометрические характеристики эпителия в рогах и теле матки крыс в норме и при моделировании гиперплазии | Morphometric characteristics of the epithelium in the horns and uterine bodies of rats in hyperplasia model and normal conditions

Измеряемый параметр Measured parameter	Экспериментальная группа Hyperplasia group (n=10)	Контрольная группа Control group (n=5)
Строма в поле зрения, площадь, мкм ² Stroma in the field of view, μm^2	366610,9 \pm 3185,1*	301641,6 \pm 62059,3
Железы в поле зрения, площадь, мкм ² Glands in the field of view, μm^2	145159,3 \pm 1761,2*	39645,39 \pm 21442,7
Отношение площади, занимаемой железами, к площади, занимаемой стромой Ratio of the area occupied by the glands to the area occupied by the stroma	0,39 \pm 0,007*	0,14 \pm 0,07
Высота просветных эпителиальных клеток, мкм Luminal epithelial cell height, μm	42,3 \pm 9,6*	21,4 \pm 4,1
Высота эпителиальных клеток в железах, мкм Height of epithelial cells in glands, μm	34,5 \pm 13,4*	17,4 \pm 3,2

* статистически значимые отличия от контрольной группы; значимость отличий определяли с использованием t-критерия Стьюдента при вероятности ошибки $p \leq 0,05$

* statistically significant differences from the control group; the significance of differences was determined using Student's t-test with $p \leq 0,05$

Таблица 2 | Table 2

Интенсивность ИГХ реакции к рецепторам овариальных гормонов, маркерам пролиферации, апоптоза, фактора роста сосудов и клеток воспаления в матке крыс экспериментальной и контрольной групп | Intensity of IHC reaction to ovarian hormone receptors, proliferation markers, apoptosis, vascular growth factor, and inflammatory cells in the uterus of rats in the experimental and control groups

Показатель Indicator	Экспериментальная группа Experimental group				Контрольная группа Control group
	коррекция индолом indole correction	коррекция полиоксидонием polyoxidonium correction	коррекция мелоксикамом meloxicam correction	ГЭ без коррекции EH without correction	
PR рог жел. PR corn gl	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
PR рог стр. PR corn str.	1,0 (1,0; 1,0)*#	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
PR тело жел. PR corpus gl.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
PR тело стр. PR corpus str.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
ER рог жел. ER corn gl.	3,0 (3,0; 3,0)#	3,0 (3,0; 3,0)	2,0 (2,0; 2,0)*	2,0 (2,0; 2,0)*	3,0 (3,0; 3,0)
ER рог стр. ER corn str.	3,0 (3,0; 3,0)#	2,0 (2,0; 2,0)*	2,0 (2,0; 2,0)*	2,0 (2,0; 2,0)*	3,0 (3,0; 3,0)
ER тело жел. ER corpus gl.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	1,0 (1,0; 1,0)*#	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
ER тело стр. ER corpus str.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	1,0 (1,0; 1,0)*#	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
VEGF рог жел. VEGF corn gl.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
VEGF рог стр. VEGF corn str.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
VEGF тело жел. VEGF corpus gl.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
VEGF тело стр. VEGF corpus str.	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)	3,0 (3,0; 3,0)
FAS рог жел. FAS corn gl.	3,0 (3,0; 3,0)*	3,0 (3,0; 3,0)*	1,0 (1,0; 1,0)#	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)
FAS рог стр. FAS corn str.	3,0 (3,0; 3,0)*	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)#	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)
FAS тело жел. FAS corpus gl.	3,0 (3,0; 3,0)*	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)#	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)
FAS тело стр. FAS corpus str.	3,0 (3,0; 3,0)*	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)#	3,0 (3,0; 3,0)*	0,0 (0,0; 0,0)
Bcl2 рог жел. Bcl2 corn gl.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Bcl2 рог стр. Bcl2 corn str.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Bcl2 тело жел. Bcl2 corpus gl.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Bcl2 тело стр. Bcl2 corpus str.	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Ki-67 рог жел. Ki-67 corn gl.	2,0 (2,0; 3,0)#	1,0 (1,0; 1,0)*	1,0 (1,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)*	2,0 (2,0; 2,0)
Ki-67 рог стр. Ki-67 corn str.	1,0 (1,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)

Таблица 2 (окончание) | Table 2 (end)

Показатель Indicator	Экспериментальная группа Experimental group				Контрольная группа Control group
	коррекция индолом indole correction	коррекция полиоксидонием polyoxidonium correction	коррекция мелоксикамом meloxicam correction	ГЭ без коррекции EH without correction	
Ki-67 тело жел. Ki-67 corpus gl.	2,0 (2,0; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (1,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)
Ki-67 тело стр. Ki-67 corpus str.	1,0 (1,0; 1,0)*	1,0 (1,0; 1,0)*	1,0 (1,0; 1,0)*	1,0 (1,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)
CD138 рог CD138 corn	3,0 (3,0; 4,0)	3,5 (3,0; 5,0)	5,0 (3,0; 6,0)#	1,5 (0,0; 3,0)*	6,0 (5,0; 8,0)
CD138 тело CD138 corpus	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 1,0)*	4,0 (3,0; 5,0)#	0,0 (0,0; 0,0)*	4,5 (3,0; 6,0)
CD20 рог CD20 corn	4,5 (3,0; 8,0)	6,5 (5,0; 8,0)	8,5 (5,0; 12,0)	5,0 (4,0; 6,0)	6,0 (4,0; 8,0)
CD20 тело CD20 corpus	2,5 (2,0; 3,0)	0,0 (0,0; 1,0)*	8,0 (6,0; 10,0)#	2,0 (0,0; 3,0)	5,0 (4,0; 6,0)
CD4 рог CD4 corn	6,5 (5,0; 7,0)	18,5 (12,0; 20,0)*#	13,5 (7,0; 30,0)#	4,0 (3,0; 9,0)	4,5 (4,0; 7,0)
CD4 тело CD4 corpus	3,0 (2,0; 4,0)	5,5 (4,0; 8,0)#	5,5 (5,0; 8,0)#	2,0 (1,0; 3,0)	3,5 (2,0; 5,0)
CD8 рог CD8 corn	6,0 (5,0; 6,0)	13,5 (9,0; 24,0)	8,5 (6,0; 19,0)	7,0 (5,0; 8,0)	6,0 (5,0; 8,0)
CD8 тело CD8 corpus	1,5 (1,0; 2,0)*	6,0 (5,0; 6,0)#	15,5 (9,0; 18,0)#	2,0 (0,0; 3,0)*	5,0 (4,0; 6,0)

жел. – интенсивность реакции к рецепторам и регуляторным белкам в железах; стр. – в строме; для маркеров клеток воспаления активность определяли только в строме;

* статистически значимые отличия от контрольной группы;

– статистически значимые отличия от группы ГЭ без коррекции; значимость отличий определяли с использованием U-критерия Манна–Уитни при вероятности ошибки $p \leq 0,05$

gl. – intensity of reaction to receptors and regulatory proteins in the glands; str. – expression in the stroma; for inflammatory cell markers, activity was determined only in the stroma;

* statistically significant differences from the control group;

– statistically significant differences from the EH group without correction. The significance of differences was determined using the Mann–Whitney U-test at $p \leq 0,05$

Значения интенсивности реакции к маркерам PR, ER, VEGF, FAS, Bcl2 и Ki67 приведены в баллах, для маркеров CD138, CD20, CD4, CD8 – число клеток в поле зрения

The intensity of reaction to markers PR, ER, VEGF, FAS, Bcl2, and Ki67 is given in points; for the markers CD138, CD20, CD4, and CD8 is provided the number of cells in the field of view

зонах. Группа с коррекцией мелоксикамом практически не отличается от контрольной группы и имеет также низкую экспрессию этого маркера, за исключением умеренного повышения в эпителии желез рога матки. Другие группы с терапевтической коррекцией значительно отличаются от группы коррекции мелоксикамом, показавшим свою эффективность по сравнению с полиоксидонием и индолом.

При гиперплазии повышается интенсивность реакции к маркеру Ki-67 в теле матки, при этом она не поддается коррекции выбранными нами препаратами: в эпителии желез количество клеток, готовых к пролиферации, больше варьирует среди подгрупп и не всегда статистически значимо. Этот показатель в железах приближается к аналогичным значениям крыс контрольной

группы и при коррекции индолом. Динамика экспрессии Ki-67 в железах не имеет закономерностей.

У крыс группы контроля лимфоциты с кластерами дифференцировки CD138, CD20, CD4 и CD8 представлены достаточно равномерно (рис.). При модели ГЭ CD138⁺ клетки в роге матки и CD8⁺ в теле встречаются редко. Все используемые нами препараты меняют соотношение клеточных популяций в эндометрии, приближая их к показателям крыс контрольной группы, однако мелоксикам более эффективен в отношении T-, B-клеток, плазмочитов и T-хелперов в роге и теле матки, а полиоксидоний преимущественно в роге. Использование всех препаратов смещает соотношение CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в сторону T-хелперов.

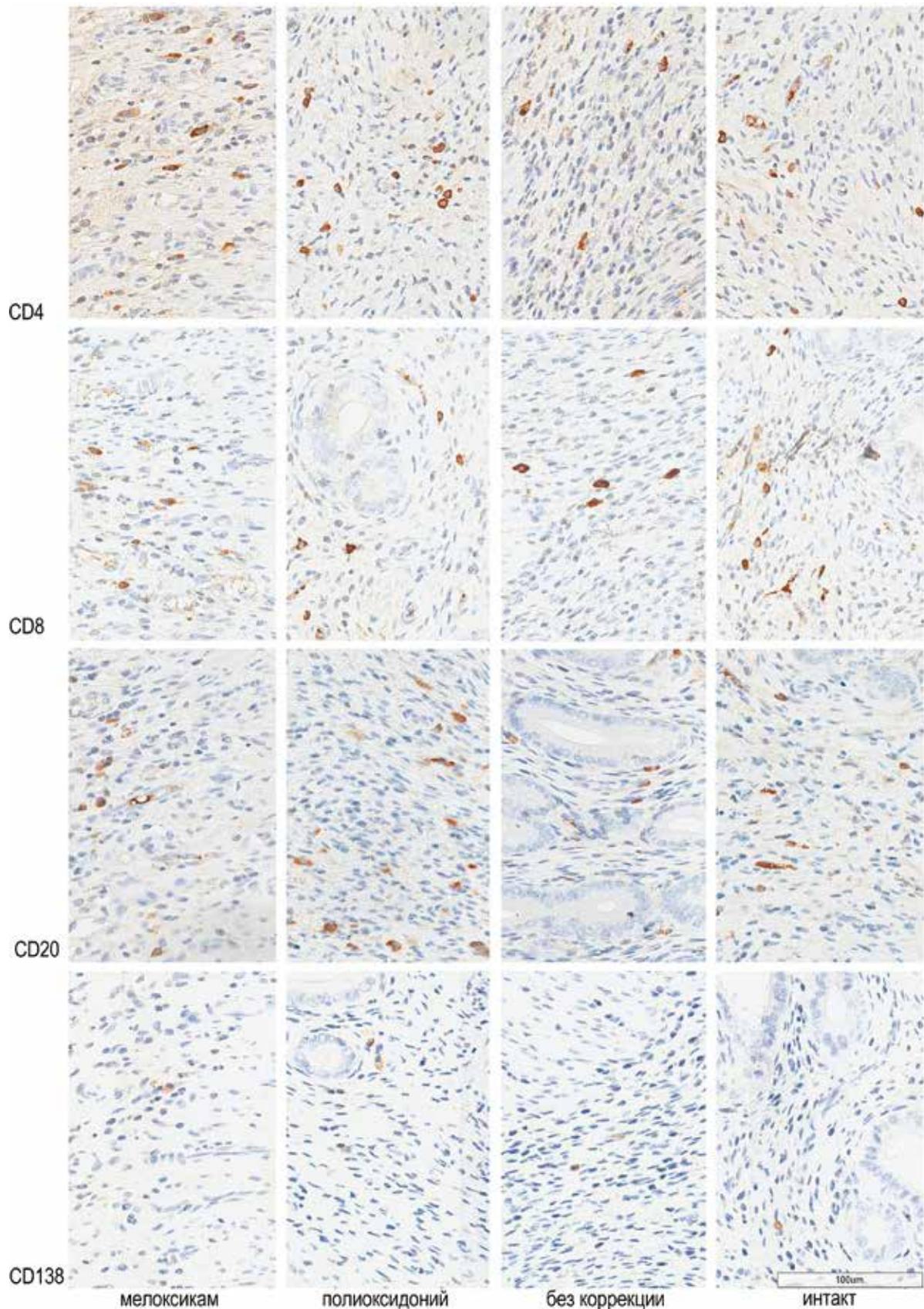


Рис. Интенсивность ИГХ реакции на маркеры воспаления в роге матки экспериментальной и контрольной групп. Иммуногистохимическое окрашивание, система детекции Bond Plimer Refine Detection System, $\times 400$

Fig. Intensity of IHC reaction to inflammatory markers in the uterine horn of the experimental and control groups. Immunohistochemical staining, detection system Bond Polymer Refine Detection System, $\times 400$

Обсуждение

Важно отметить, что эпителий тела матки крысы по аналогии с шейкой матки женщины по сравнению с зонами вынашивания плода не только является пролиферативно, метапластически и трансформационно более опасной зоной, но и больше подвержен инфицированию вследствие контакта через влагалище с внешней средой. В связи с этим максимальный эффект мелоксикама в данной зоне представляет терапевтический интерес в качестве противовоспалительного препарата, опосредованно (через простагландины и цитокины) снижающего чувствительность клеток к избытку эстрогенов. Динамика лимфоцитов различных популяций в эндометрии не противоречит базовым понятиям патофизиологии воспаления, поскольку мы работаем с моделью не воспаления, а гиперплазии и эндокринной дисрегуляции, где изменения воспалительных маркеров носят характер вторичных, а ингибиторы циклооксигеназы-2 нормализуют гистофизиологию матки опосредованно. При этом присутствие иммунокомпетентных клеток в умеренном количестве является базой иммунного гомеостаза, о чем свидетельствуют результаты измерений в тканях крыс контрольной группы. Описанные разными авторами общие патологические закономерности ГЭ требуют дальнейшего изучения, однако все они созвучны теории Д. Ханахана и Р. Вайнберга, выделяющей ряд признаков трансформации клеток [18].

Заключение

При гиперплазии эндометрия компенсаторно снижаются количество рецепторов эстрогена, активность пролиферации в железах и число В-лимфоцитов, но резко активируется апоптоз. При этом индол оказывает антиэстрогенный эффект за счет роста чувствительности к прогестерону и приближает экспрессию маркера пролиферации в железах к значениям контрольной группы, а мелоксикам – к норме число рецепторов апоптоза, маркеров пролиферации и инфльтрации иммунными клетками. В эффекте мелоксикама обращает на себя внимание то, что он нормализует все показатели рога матки, за исключением экспрессии рецепторов эстрогенов, на которую он влияет лишь в теле матки крыс. В наиболее опасной в плане пролиферации и метаплазии зоне изгнания плода (аналог шейки матки женщины) динамика иная: на модели гиперплазии эндометрия увеличивается активность рецепторов апоптоза и пролиферации и снижается число Т- и В-лимфоцитов, при этом мелоксикам оказывает выраженное антиэстрогенное действие, нормализует показатели числа иммунокомпетентных клеток и, как и в других участках матки, нормализует кинетику клеточных популяций, что проявляется нормализацией экспрессии маркера апоптоза, а индол и полиоксидоний не оказывают такого эффекта.

Выявленные закономерности взаимосвязанных гиперпластических и иммунных изменений эндометрия

представляют интерес для продолжения исследования их как диагностических критериев и патогенетической коррекции в практической медицине.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Кубышкин.
Сбор и обработка материала – Н.И. Волоцкая, Н.С. Прасолов, И.Г. Подгорный, Т.П. Макалиш, М.А. Кальфа.
Написание текста – Н.И. Волоцкая, Е.Ю. Зяблицкая.
Редактирование – Е.П. Коваленко.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Kubyshkin.
Collected the data and performed the analysis – N.I. Volotskaya, N.S. Prasolov, I.G. Podgorny, T.P. Makalish, M.A. Kalfa.
Wrote the paper – N.I. Volotskaya, E.Yu. Zyablitskaya.
Edited the manuscript – E.P. Kovalenko.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
2. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978–2013. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(4):354–61. DOI: 10.1093/jnci/djx214.
3. Волоцкая Н.И., Сулима А.Н., Румянцева З.С. Менопауза: современные стандарты диагностики и коррекции нарушений. *Врач.* 2021;32(3):66–72. DOI: 10.29296/25877305-2021-03-12.
Volotskaya NI, Sulima AN, Rumyantseva ZS. Menopause: modern standards of diagnosis and correction of disorders. *Vrach = The Doctor.* 2021;32(3):66–72 (In Russ.). DOI: 10.29296/25877305-2021-03-12.
4. Карапетян О.В., Фомочкина И.И., Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин В.А., Коваленко Е.П., Коробова П.Г. и др. Состояние локальных маркеров воспаления и апоптоза в эндометрии при гиперплазиях различной степени тяжести. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020;15(3):342–347. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15081.
Karapetyan OV, Fomochkina II, Zyablitskaya EYu, Kubyshkin VA, Kovalenko EP, Korobova PG et al. The state of local markers of inflammation and apoptosis in endometry in hyperplasia of various degrees of severity. *Medical News of North Caucasus.* 2020;15(3):342–347 (In Russ.). DOI: 10.14300/mnnc.2020.15081.
5. Траль Т.Г., Толибова Г.Х., Коган И.Ю. Имплантационная несостоятельность эндометрия в циклах экстракорпорального оплодотворения у пациенток с хроническим эндометритом. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(1):24–33. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.24-33.
Tral TG, Tolibova GK, Kogan IYu. Endometrial implantation failure in cycles of *in vitro* fertilization in patients with chronic endometritis. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):24–33 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.24-33.

6. 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, management and associated infertility. Clinical and experimental morphology. 2020;9(2):16–25 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.16-25.
7. Singh S, Pavuluri S, Lakshmi BJ, Biswa BB, Venkatachalam B, Tripura C et al. Molecular characterization of Wdr13 knockout female mice uteri: a model for human endometrial hyperplasia. *Sci Rep.* 2020;10(1):14621. DOI: 10.1038/s41598-020-70773-w.
8. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Артымук Н.В., Башмакова Н.В., Беженарь В.Ф., Белокриницкая Т.Е. и др. Гиперплазия эндометрия. Клинические рекомендации. Москва, 2021. 45 с. Доступно по адресу: <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-giperplazija-endometrija-utv-minzdravom-rossii> (получено 19.12.2022).
Adamyan LV, Andreeva EN, Artymuk NV, Bashmakova NV, Bezhenar VF, Belokrinitskaya TE et al. Endometrial hyperplasia. Clinical recommendations. Moscow, 2021. 45 p. (In Russ.). Available from: https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-giperplazija-endometrija-utv-minzdravom-rossii (accessed 19.12.2022).
9. Morsy MA, Abdelraheem WM, El-Hussieny M, Refaie MMM. Protective effects of irbesartan an angiotensin receptor blocker with PPAR γ agonistic activity, against estradiol benzoate-induced endometrial hyperplasia and atypia in female rats via modulation of TNF α /Survivin pathway. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(7):649. DOI: 10.3390/ph14070649.
10. Santamaria X, Mas A, Cervelló I, Taylor H, Simon C. Uterine stem cells: from basic research to advanced cell therapies. *Hum Reprod Update.* 2018;24(6):673–93. DOI: 10.1093/humupd/dmy028.
11. Terzic M, Aimagambetova G, Kunz J, Bapayeva G, Aitbayeva B, Terzic S et al. Molecular basis of endometriosis and endometrial cancer: current knowledge and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9274. DOI: 10.3390/ijms22179274.
12. Габидуллина Р.И., Смирнова Г.А., Нухбала Ф.Р., Валева Е.В., Орлова Ю.И., Шакиров А.А. Гиперпластические процессы эндометрия: современная тактика ведения пациенток. Гинекология. 2019;21(6):53–58. DOI: 10.26442/20795696.2019.6.190472.
Gabidullina RI, Smirnova GA, Nuhbala FR, Valeeva EV, Orlova YuI, Shakirov AA. Hyperplastic processes of the endometrium: modern tactics of patient management. Gynecology. 2019;21(6):53–58 (In Russ.). DOI: 10.26442/20795696.2019.6.190472.
13. Refaie MMM, El-Hussieny M. The role of interleukin-1b and its antagonist (diacerein) in estradiol benzoate-induced endometrial hyperplasia and atypia in female rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2017;31(4):438–46. DOI: 10.1111/fcp.12285.
14. Doherty MT, Sanni OB, Coleman HG, Cardwell CR, McCluggage WG, Quinn D et al. Concurrent and future risk of endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0232231. DOI: 10.1371/journal.pone.0232231.
15. Royal College of Obstetrician and Gynecologists. Management of Endometrial Hyperplasia. GreenTop Guideline No. 67. RCOG/BSGE Joint Guideline – February 2016. Available from: https://www.rcog.org.uk/media/knmjbj5c/gtg_67_endometrial_hyperplasia.pdf (accessed 19.12.2022).
16. Болтовская М.Н., Табеева Г.И., Тихонова Н.Б., Александрина В.В., Асатурова А.В., Вишнякова П.А. и др. Разработка экспериментальной модели патологии эндометрия (синдрома Ашермана). Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(1):77–86. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.77-86.
Boltovskaya MN, Tabeeva GI, Tikhonova NB, Aleksankina VV, Asaturova AV, Vishnyakova PA et al. Development of an experimental model of endometrial pathology (Asherman syndrome). Clinical and experimental morphology. 2023;12(1):77–86 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.77-86.
17. Кумар Г.Л., Рудбек Л. Иммуногистохимические методы: Руководство. Пер. с англ. / Под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. Москва, 2011. 224 с.
Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical methods: A guide. Transl. from Eng. / Ed. by GA Frank, PG Malkov. Moscow, 2011. 224 p. (In Russ.).
18. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Информация об авторах

Надежда Игоревна Волощак – младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Татьяна Павловна Макалиш – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Георгий Игоревич Подгорный – врач акушер-гинеколог городской больницы № 6 Ростова-на-Дону.

Маргарита Алексеевна Кальфа – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Никита Сергеевич Прасолов – лаборант-исследователь центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Анатолий Владимирович Кубышкин – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Евгения Павловна Коваленко – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Евгения Юрьевна Зяблицкая – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Author information

Nadezhda I. Volotskaya – Junior Researcher, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0003-2304-659X>

Tatyana P. Makalish – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>

Georgy I. Podgorny – Obstetrician-Gynecologist, Rostov-on-Don City Hospital No. 6.

<https://orcid.org/0000-0003-0004-572X>

Margarita A. Kalfa – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0002-7179-3402>

Nikita S. Prasolov – Laboratory Research Assistant, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0002-6436-8125>

Anatoly V. Kubyshkin – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of General and Clinical Pathophysiology, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0002-1309-4005>

Evgenia P. Kovalenko – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0002-8899-0031>

Evgenia Yu. Zyablitskaya – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor S.I. Georgievsky Medical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

<https://orcid.org/0000-0002-1339-9773>

Оптимизация протокола макроскопического исследования почки после нефрэктомии при новообразовании

Т.А. Гаркуша^{1,2}

¹ КГБУЗ Красноярское краевое патологоанатомическое бюро, Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

Резюме. Введение. Чаще показанием к нефрэктомии является опухоль почки. По данным литературы, при злокачественных новообразованиях могут развиваться паранеопластические гломерулопатии и нарушения обмена веществ, проявляющиеся в том числе нефропатиями. Наряду с этим гломерулопатии и нарушения обмена веществ могут быть не связаны с опухолью. Цель исследования – разработать методику макроскопического анализа препарата почки с опухолью, полученного после нефрэктомии, с забором материала для проведения иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии.

Материалы и методы. Проанализирован 171 образец почки с опухолью после нефрэктомии с проведением эксперимента по определению оптимального расстояния для забора образцов паренхимы почки от опухоли.

Результаты. Представлен оптимизированный протокол макроскопического исследования препарата почки с опухолью, полученного после нефрэктомии. Оценено оптимальное расстояние от опухоли для забора образцов паренхимы почки (3 см).

Заключение. Гломерулопатии характеризуются двусторонним поражением независимо от происхождения. Протекая нередко бессимптомно или малосимптомно, они приводят к снижению функции почки. Таким образом, одномоментная диагностика гломерулярной патологии у пациентов с опухолью почки может стать единственной возможностью для диагностики гломерулопатий. Описанный метод позволяет достоверно диагностировать гломерулопатии у данной категории пациентов, что способствует своевременному назначению терапии и предотвращению быстрого прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: почка, опухоль, гломерулопатии, операционный материал, макроскопическое исследование

Для корреспонденции: Татьяна Андреевна Гаркуша. E-mail: sapfiradracula@yandex.ru

Для цитирования: Гаркуша Т.А. Оптимизация протокола макроскопического исследования почки после нефрэктомии при новообразовании. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):69–75. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.1.69-75.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 14.11.2022. Получена после рецензирования 07.12.2022. Принята в печать 12.12.2022.

Optimization of the protocol for kidney gross examination after nephrectomy due to neoplasm

T.A. Garkusha^{1,2}

¹ Krasnoyarsk Regional Pathoanatomical Bureau, Krasnoyarsk, Russia

² V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Abstract. Introduction. Nephrectomy is most often performed to treat kidney cancer. Literature suggests that malignant neoplasms can develop paraneoplastic glomerulopathies and metabolic disorders, including nephropathies. Moreover, glomerulopathies and metabolic disorders may not be associated with a tumor. The aim of the study was to develop a method for gross examination of the kidney with a tumor obtained after nephrectomy, with attention being paid to sample collection for immunofluorescence and electron microscopy.

Materials and methods. I analyzed 171 kidney samples after nephrectomy due to tumors to detect the appropriate distance for kidney parenchyma sampling from the tumor on a pilot basis.

Results. I present an optimized protocol for kidney gross examination after nephrectomy due to a neoplasm. I estimated the appropriate distance from the tumor for sampling the kidney parenchyma to be at 3 cm.

Conclusion. Glomerulopathies are characterized by bilateral lesions, regardless of their origin. Often being asymptomatic or oligosymptomatic, they lead to a decreased kidney function. The simultaneous morphological diagnosis of glomerular pathology in patients with a kidney tumor may be the only option to diagnose glomerulopathies in time. The described method allows a reliable diagnosis of glomerulopathy in these patients. This, in turn, will help health care providers to initiate therapy in good time and prevent rapid disease progression.

Keywords: kidney, tumor, glomerulopathies, surgical sample, gross examination

Corresponding author: Tatyana A. Garkusha. E-mail: sapfiradracula@yandex.ru

For citation: Garkusha T.A. Optimization of the protocol for kidney gross examination after nephrectomy due to neoplasm. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):69–75 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.69-75.

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

Received 14.11.2022. **Received in revised form** 07.12.2022. **Accepted** 12.12.2022.

Введение

Нефрэктомия в большинстве случаев выполняется при наличии опухоли. Наиболее часто встречающимися опухолями почки, по данным Международной гистологической классификации опухолей мочевыделительной системы и мужских половых органов, являются светлоклеточная, папиллярная и хромофобная почечно-клеточная карциномы. Реже встречаются доброкачественные опухоли почки, например онкоцитомы и ангиомиолипомы [1]. В литературе имеются данные о развитии при злокачественных новообразованиях паранеопластических гломерулопатий, а также нефропатий, связанных с нарушением метаболизма [2–12]. Наряду с этим у пациентов могут быть гломерулопатии и нарушения обмена веществ, не связанные с опухолью [13]. Паранеопластические и первичные гломерулопатии не имеют морфологических отличий и независимо от происхождения характеризуются двусторонним поражением. Гломерулопатии часто протекают бессимптомно или только с изменением лабораторных показателей, в связи с чем они длительное время остаются недиагностированными. Нефропатии при длительном течении без лечения могут приводить к нефросклерозу.

Чаще при исследовании образцов почки с опухолью онкоморфолог делает акцент на изучении новообразования, оставляя без внимания другие заболевания почек. Вместе с этим для пациента, которому была выполнена нефрэктомия, одномоментная диагностика неопухолевого заболевания почек может стать единственной возможностью установления диагноза и назначения терапии, направленной на лечение гломерулопатий.

Имеющиеся в доступной литературе описания этапов морфологического исследования операционного материала почки, резецированной по поводу опухоли, направлены преимущественно на диагностику новообразования, при этом забор материала для проведения иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии не проводится [14–15]. В рекомендациях Н.W. Westra et al. имеются упоминания о возможности забора материала для проведения дополнительных исследований без описания этапов забора и обработки [16].

Цель исследования – разработать методику макроскопического анализа препарата почки с опухолью, полученного после нефрэктомии, с забором материала для проведения иммунофлуоресценции и электронной микроскопии, для одномоментной диагностики опухолевого процесса и гломерулопатий.

Материалы и методы

В исследование был включен 171 образец почки с опухолью, полученный после проведения нефрэктомии. Возраст пациентов находился в диапазоне 24–85 лет, медиана возраста составила 63 года. Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют этическим требованиям, Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 года и ее последующим изменениям. От каждого включенного в исследование участника получено добровольное информированное согласие.

Проведен эксперимент по определению оптимального расстояния от опухоли для забора образцов паренхимы почки с целью оценки ее гломерулярного аппарата. Забор образцов выполнялся по периферии опухоли, на расстоянии 1 см, 2 см, 3 см и более. Проводили независимую слепую оценку получаемых образцов тремя опытными патологоанатомами. Определяли наличие и выраженность изменений ткани почки, обусловленных механическим воздействием опухоли, – сдавление структур почки, их склероз (табл.).

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, Конго красным, были выполнены ПИК (PAS) реакция, импрегнирование препаратов почки метенамином серебром и трихромная окраска по Массону. Реакция иммунофлуоресценции выполнена с применением меченых антител IgA-FITC – поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания), IgG-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания), IgM-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания), C3c-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания), C1q-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания), Kappa light chain-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания) и Lambda light chain-FITC, поликлональные (Diagnostic BioSystems, Испания). Оценку препаратов

Таблица | Table

Информативность образцов ткани почки в зависимости от расстояния от опухоли | Informative value of kidney tissue samples based on the distance from the tumor

Забор образцов по периферии опухоли Sampling at the tumor periphery		Забор образцов на расстоянии 1 см от опухоли Sampling at a 1-cm distance from the tumor		Забор образцов на расстоянии 2 см от опухоли Sampling at a 2-cm distance from the tumor		Забор образцов на расстоянии 3 см и более от опухоли Sampling at a distance of 3 cm or more from the tumor	
Неинформативные образцы Non-diagnostic samples	Информативные образцы Diagnostic samples	Неинформативные образцы Non-diagnostic samples	Информативные образцы Diagnostic samples	Неинформативные образцы Non-diagnostic samples	Информативные образцы Diagnostic samples	Неинформативные образцы Non-diagnostic samples	Информативные образцы Diagnostic samples
100%	0%	78,4%	21,6%	36,6%	63,4%	0%	100%

выполняли с применением флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия). Фиксацию и проводку материала для электронной микроскопии осуществляли по стандартной методике с контрастированием срезов 0,1% раствором цитрата свинца. Электронномикроскопическое исследование образцов проводилось с применением трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 PLUS (Zeiss, Германия) при разном увеличении и с выполнением картирования изображения для формирования обзорных снимков. Оценивали снимки изображения, полученные камерой Dual Speed 220V 50-60Hz, SN 441/13 (TRS, Германия).

Морфометрический анализ изображений выполняли с применением программного обеспечения iTEM Olympus (Olympus, Япония). Оценку качества получаемых образцов для различных методов исследования по предлагаемому протоколу проводили путем независимого слепого пересмотра препаратов тремя опытными патологоанатомами по шкале: оптимально, субоптимально, плохо. Под оптимальным понимали результат, отвечающий всем критериям морфологической диагностики. Под субоптимальным понимали результат, при котором определялись дефекты морфологической картины, не влияющие на качество достоверной диагностики. К плохому результату относили случаи, в которых дефекты морфологической картины не позволяли провести исследование.

Результаты

Для исследования предложен протокол, согласно которому операционный материал необходимо доставлять в лабораторию без фиксирующего раствора в течение 1 часа после нефрэктомии. В направлении на прижизненное патологоанатомическое исследование должны быть указаны соответствующие паспортные и клинические данные, в том числе общий анализ мочи, биохимический анализ крови, анамнестические данные, сведения о наличии коморбидных заболеваний.

Для правильной ориентации образца в направлении на патологоанатомическое исследование хирург должен указать сторону поражения. В определении верхнего и нижнего полюсов помогают мочеточник и надпочечник. Мочеточник направлен вниз, надпочечник располагается у верхнего полюса почки. Патологоанатом определяет расположение структур синуса (артерия, вена, мочеточник), вводит в вену металлический зонд.

На следующем этапе проводится осмотр доставленного образца на наличие повреждений капсулы, представленной фасцией Герота. При наличии повреждений до совершения разрезов проводится маркирование дефектов гистологическими красителями. Маркирование края резекции всего образца нецелесообразно, так как обычно опухоль не выходит за пределы фасции Герота. Маркирование краев резекции проводится в участках дефектов фасции Герота. Первый разрез проводят вдоль длинной оси почки для визуализации чашечно-лоханочной системы, сосудов. Наличие инвазии должно быть отражено в протоколе исследования. Затем проводят разрезы по ходу зонда, установленного в устье почечной вены, для выявления инвазии в венозную систему.

Для проведения реакции иммунной флуоресценции осуществляют забор фрагмента паренхимы почки на расстоянии не менее 3 см от опухоли. Фрагмент должен содержать корковое и мозговое вещество почки, жировая клетчатка удаляется для улучшения качества препаратов, изготавливаемых при помощи криостатного микротомы (рис. 1 А, В). Фрагмент толщиной 0,3–0,5 см помещают в матричную среду для криотомии и замораживают в течение 2–3 минут при температуре –60°C. Изготавливают срезы толщиной 5–6 мкм. На гистологическое стекло помещают 1–2 среза. Полученные препараты хранят в холодильной камере при температуре от +2 до +4°C. Хранить препараты можно в течение 5 дней.

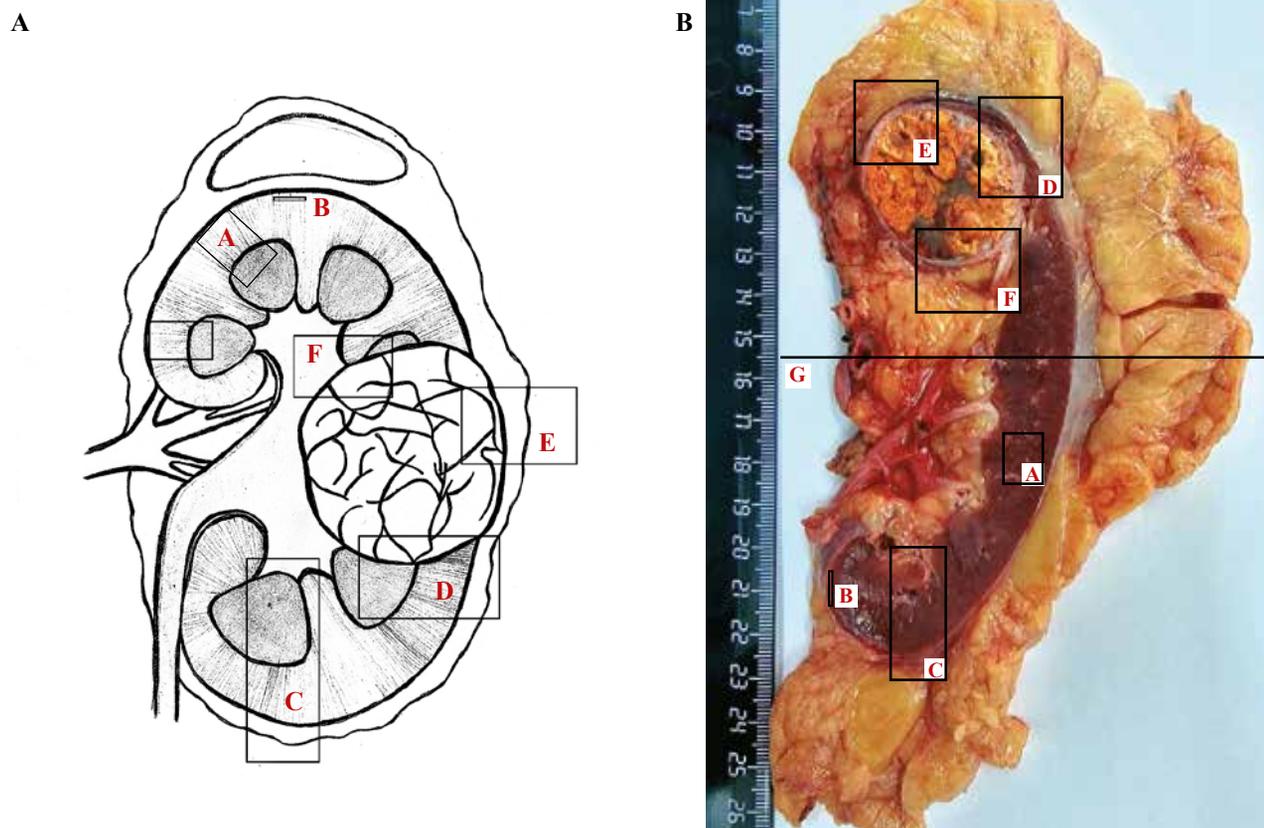


Рис. 1. Макроскопическое исследование почки с опухолью после нефрэктомии.

А – схема вырезки образца почки, В – макрофотография почки после нефрэктомии с разметкой.

Обозначения на рисунках: А – фрагмент ткани почки для проведения реакции иммунофлуоресценции, В – фрагмент ткани почки для электронной микроскопии, С – фрагмент ткани почки для светооптического исследования, D – фрагмент опухоли и ткани почки, E – фрагмент опухоли почки с паранефральной жировой клетчаткой, F – фрагмент опухоли почки с почечным синусом, G – линия забора образцов для исследования ткани почки

Fig. 1. Gross examination of the kidney with a tumor after nephrectomy.

A – sampling scheme. B – close-up of the kidney with a tumor after nephrectomy.

Legend: A – a fragment of the kidney parenchyma for immunofluorescence reaction, B – fragment of the kidney parenchyma for electron microscopy, C – fragment for light microscopy, D – fragment of the tumor and kidney parenchyma, E – fragment of the kidney tumor with perirenal adipose tissue, F – fragment of the kidney tumor with renal sinus, G – sampling line for examination of the kidney parenchyma

Фрагмент для электронной микроскопии должен быть получен из участка коркового вещества почки, расположенного на расстоянии не менее 3 см от опухоли и на расстоянии 1 мм от капсулы почки. Забор фрагмента размерами 0,1×0,1×0,5–1,0 см производят из коркового вещества вдоль капсулы почки. При помощи стереомикроскопа полученный образец разделяют на фрагменты площадью не более 1 мм² и помещают в 1,5–2% раствор глутарового альдегида, изготовленного *ex tempore*, на 1–2 часа при температуре +25°C или в холодильную камеру при температуре +2 до +4°C на 1–2 недели.

Образец почки с продольным разрезом оставляют фиксироваться в 10% нейтральном забуференном формалине на 24 часа.

После фиксации образец взвешивают и проводят измерение присланного образца почки с опухолью и жировой тканью; измеряют почку с опухолью без жировой клетчатки.

Далее необходимо описать локализацию и измерить размер опухоли. При наличии нужно отразить в протоколе инвазию в почечный синус, венозную систему почки, чашечно-лоханочную систему, паранефральную клетчатку и другие окружающие структуры. Очаги инвазии в паранефральную клетчатку и жировую клетчатку почечного синуса должны быть включены в размер опухоли, тогда как очаги отсева и массы в почечной вене в размер опухоли не включают. Для точного измерения размера опухоли выполняют перпендикулярные разрезы к длинной оси почки.

Характеристика опухоли также должна быть отражена в протоколе: форма, консистенция, цвет, наличие кровоизлияний и некрозов, а также объем последних (имеет прогностическое значение при светлоклеточной почечно-клеточной карцине). При неоднородности опухолевого узла фрагменты забирают из разных участков, что может помочь в постановке диагноза и градации опухоли.

При описании паренхимы почки вне опухоли необходимо измерить толщину коркового и мозгового слоев, оценить четкость границ между ними, зафиксировать кровоизлияния и другие изменения.

Надпочечник измеряют, отмечают его цвет, при наличии узлового образования его описывают по схеме макроскопического исследования опухоли почки.

Проводя вырезку материала, необходимо взять для исследования по одному фрагменту опухоли на каждый сантиметр ее максимального размера и, при гетерогенности узла, из разных участков. При опухоли размером до 2 см ее забирают для исследования целиком. Обязателен забор фрагментов опухоли, находящихся рядом с чашечно-лоханочной системой, жировой клетчаткой почечного синуса и паранефральной клетчаткой. Если инвазия в окружающие структуры неочевидна, рекомендуется забор минимум трех фрагментов из подозрительного участка.

При мультифокальном поражении исследуются минимум пять наибольших по размеру опухолей.

Отдельные узлы в жировой клетчатке почечного синуса, как правило, представлены очагами инвазии опухоли в венозную систему почки.

Проводят забор минимум одного фрагмента паренхимы почки на расстоянии не менее 3 см от опухоли.

На исследование берут края резекции артерии, вены и мочеточника, даже если макроскопических изменений в них нет. Далее вену, артерию и мочеточник рассекают продольно и проводят забор измененных участков.

При исследовании жировой клетчатки забирают все лимфатические узлы с описанием структуры и размера.

Из надпочечника берут по одному фрагменту неизмененной ткани и опухолевого образования (при наличии).

Полученные фрагменты укладывают в гистологические кассеты и помещают в 10% нейтральный забуференный формалин на 24 часа.

Был проведен анализ 171 образца резецированной почки по поводу опухоли с забором материала для иммунной флуоресценции и электронной микроскопии. Механическое воздействие опухоли на паренхиму почки характеризуется сдавлением структур нефрона, сопровождающимся глобальным и сегментарным склерозом клубочков, перигломерулярным склерозом со сдавлением капиллярных петель клубочка, склерозом интерстиция и атрофией канальцев.

В части случаев по периферии опухоли имелась воспалительная инфильтрация интерстиция разной степени выраженности, у некоторых пациентов с вовлечением канальцев и клубочков. Описанные изменения неизменно присутствовали в образцах ткани почки, забранных на расстоянии до 3,0 см, и носили вторичный компрессионный по отношению к опухоли характер (табл.).

Оценку структур нефрона проводили на срезах толщиной 2,5–3 мкм с применением гистохимического окрашивания (рис. 2 А, В). Это позволило оценить клеточность клубочков, структуру гломерулярной базальной мембраны, изменения стенки сосудов и наличие в просвете тромбов, эпителий канальцев, склероз и инфильтрацию интерстиция.

При оценке препаратов, полученных после проведения реакции иммунофлуоресценции, при наличии отложения иммунных комплексов имелось свечение в мезангии или по базальной мембране (рис. 3).

Полученные для электронной микроскопии образцы не отличались от образцов, полученных при пункционной нефробиопсии (рис. 4). Образцы позволили оценить гломерулярные базальные мембраны, мезангий,

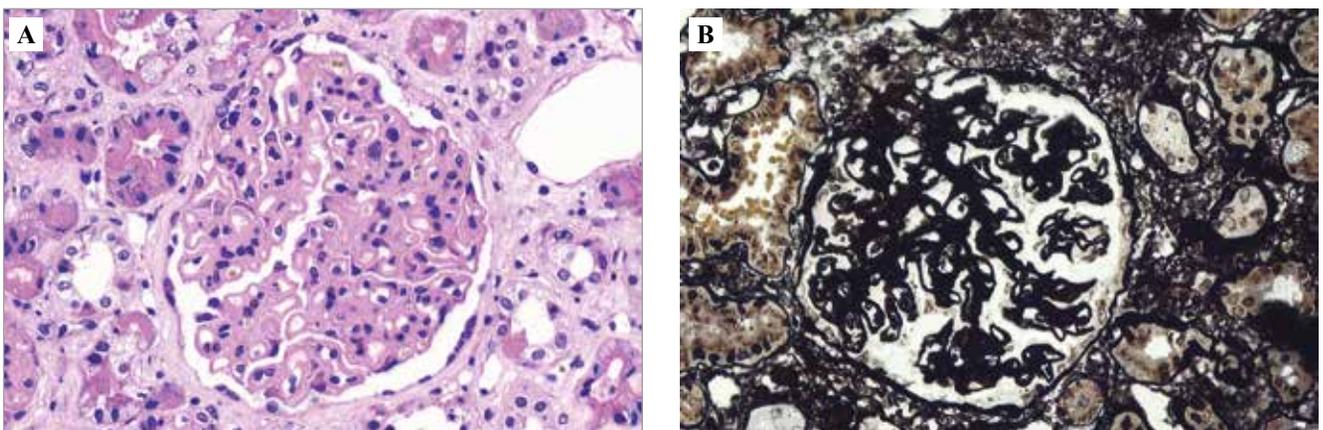


Рис. 2. Микрофотографии образцов почки.

А – диффузное утолщение базальной мембраны у пациента с мембранозной нефропатией, В – диффузное утолщение базальной мембраны с формированием шпиков у пациента с мембранозной нефропатией. А – окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. В – окраска метенамин серебром, $\times 400$

Fig. 2. Microscopic images of kidney parenchyma samples.

А – diffuse basement membrane thickening in a patient with membranous nephropathy, В – diffuse basement membrane thickening with spine formation in a patient with membranous nephropathy. А – H&E stain, $\times 400$. В – methenamine silver stain, $\times 400$

а также визуализировать депозиты иммунных комплексов при их наличии.

При независимой оценке полученных препаратов, включая результаты электронномикроскопического исследования, среди независимых врачей-патолого-

анатомов получена полная конкордантность мнений с оценкой всех образцов как «оптимально».

Обсуждение

Гломерулярная патология носит двусторонний характер и может протекать бессимптомно или малосимптомно. Гломерулопатии могут представлять собой проявление паранеопластического синдрома либо являться самостоятельным заболеванием. Они приводят к снижению функции почки, в части случаев с развитием терминальной почечной недостаточности. При этом выраженное снижение скорости клубочковой фильтрации является противопоказанием для назначения некоторых химиотерапевтических лекарственных препаратов. Примененная в настоящем исследовании методика позволила наряду с опухолевыми процессами убедительно диагностировать гломерулярную патологию в 39,8% случаев.

При изучении доступной литературы не найдено описания методики одномоментного забора материала для иммунофлуоресценции и электронной микроскопии при макроскопическом исследовании почек после проведения нефрэктомии по поводу опухолевых процессов. В то же время одномоментная диагностика гломерулопатий для данной категории пациентов может являться единственной возможностью установления диагноза неопухолевого заболевания почек.

Заключение

Описанный метод позволяет проводить достоверную одномоментную диагностику заболеваний почек у пациентов, которым была выполнена нефрэктомия в связи с опухолью почки. Ранняя диагностика нефропатий дает возможность своевременно начать их лечение и предотвратить быстрое снижение функции единственной оставшейся почки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

Литература/References

1. MB Amin, DM Berney, EM Comperat, A Hartmann, S Menon, GJ Netto et al. (eds.). WHO classification of tumours. Urinary and male genital tumours. V. 8. 5th ed. Lyon: IARC, 2022. 576 p.
2. Rosner MH, Jhaveri KD, McMahon BA, Perazella MA. Onconephrology: The intersections between the kidney and cancer. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):47–77. DOI: 10.3322/caac.21636.
3. Khan MB, Kaur A, Ali A, Boris A, Spitalewitz S. Complete resolution of paraneoplastic membranous nephropathy following curative therapy of triple-negative breast cancer. *Cureus.* 2021;13(9):e18125. DOI: 10.7759/cureus.18125.
4. Jeyabalan A, Trivedi M. Paraneoplastic glomerular diseases. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2022;29(2):116–26.e1. DOI: 10.1053/j.ackd.2022.02.009.

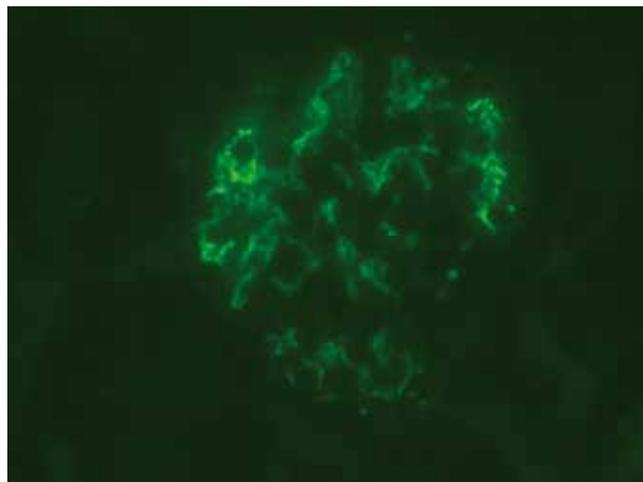


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная микроскопия с антителами к IgA. Мезангиальное свечение в реакции с антителами к IgA у пациента с IgA-нефропатией. Окраска IgA-FITC, $\times 400$

Fig. 3. Immunofluorescence microscopy with anti-IgA antibodies. Mesangial luminescence in reaction with anti-IgA antibodies in a patient with IgA nephropathy. IgA-FITC, $\times 400$

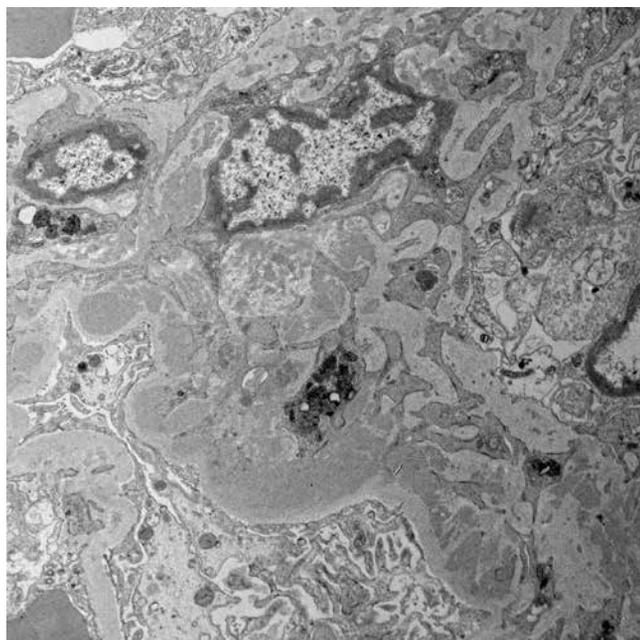


Рис. 4. Ультраструктурные изменения при IgA-нефропатии. Электронная микроскопия, контрастирование уранил ацетатом и цитратом свинца, $\times 1540$

Fig. 4. Ultrastructural features of IgA nephropathy. Electron microscopy, contrasting with uranyl acetate and lead citrate, $\times 1540$

5. *Amarapurkar P, Bou-Slaiman S, Madrid B, Ladino M.* Paraneoplastic glomerular disease: The struggle is real. *Journal of Onco-Nephrology.* 2019;3(1):31–8. DOI: 10.1177/2399369319828732.
6. *Ng MSY, Francis L, Pillai E, Mallett AJ.* Paraneoplastic immunoglobulin A nephropathy and associated focal segmental glomerulosclerosis in asymptomatic low volume B-cell lymphoma – a case report. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):224. DOI: 10.1186/s12882-018-1034-y.
7. *Al-Kharouf I, Fields T, Hamza A.* Paraneoplastic nephropathy with peculiar immunofluorescence pattern: Report of a rare case. *Am J Clin Pathol.* 2022;158(S1):S155–6. DOI: 10.1093/ajcp/aqac126.331.
8. *Nasr SH, Wehbe E, Said SM, Dasari S, Quoc T, Kurtin PJ.* Paraneoplastic cast nephropathy associated with pancreatic mixed acinar-neuroendocrine carcinoma: a case report. *Am J Kidney Dis.* 2019;74(4):558–62. DOI: 10.1053/j.ajkd.2019.02.010.
9. *Jeyabalan A, Geara AS, Frey NV, Palmer MD, Hogan JJ.* Paraneoplastic focal segmental glomerulosclerosis associated with acute lymphocytic leukemia. *Kidney Int Rep.* 2019;4(10):1494–8. DOI: 10.1016/j.ekir.2019.06.010.
10. *Yu X, Fan Z, Chen W, Wang Z.* Lung cancer with nephrotic syndrome as a paraneoplastic syndrome: a case report. *Mol Clin Oncol.* 2020;13(6):86. DOI: 10.3892/mco.2020.2156.
11. *Jhaveri KD, Shah HH, Patel C, Kadiyala A, Stokes MB, Radhakrishnan J.* Glomerular diseases associated with cancer, chemotherapy, and hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2014;21(1):48–55. DOI: 10.1053/j.ackd.2013.08.003.
12. *Гаркуша Т.А., Быханова Е.А., Хоржевский В.А., Ганноев С.В., Фирсов М.А., Ивлиев С.В.* Частота встречаемости гломерулопатий при новообразованиях почек в Красноярске. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2022;11(3):15–21. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.15-21.
13. *Garkusha TA, Bykhanova EA, Khorzhevskii VA, Gappoev SV, Firsov MA, Ivliev SV.* The incidence of glomerulopathies in kidney neoplasms in Krasnoyarsk. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(3):15–21 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.15-21.
14. *Ю.А. Криволапов (ред.).* Макроскопическое исследование биопсийного и операционного материала: Руководство для врачей-патологоанатомов. Москва: Практическая медицина, 2020. 352 с.
15. *Ковылина М.В., Прилепская Е.А., Решетов Л.В., Горбань Н.А., Пушкарь Д.Ю.* Макроскопическое исследование почки. *Онкопатология.* 2021;4(1–2):42–48. DOI: 10.17650/2618-7019-2021-4-1-2-42-48.
16. *Westra HW, Hruban RH, Phelps TH, Isacson C.* Surgical pathology dissection: An illustrated guide. 2nd ed. Springer, New York, 2003. 278 p.

Информация об авторе

Татьяна Андреевна Гаркуша – врач-патологоанатом Красноярского краевого патологоанатомического бюро, ассистент кафедры патологической анатомии имени профессора П.Г. Подзолкова Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Author information

Tatyana A. Garkusha – Pathologist, Krasnoyarsk Regional Pathoanatomical Bureau; Teaching Assistant, P.G. Podzolkov Pathology Department, V.F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-3343-6973>

Практический опыт применения цито-гистологической корреляции как способ обеспечения контроля качества исследований при диагностике патологии шейки матки

М.И. Пахарукова^{1,2}, Е.Е. Лысак¹, К.В. Рыжанкова¹, М.А. Котугина¹,
Л.Н. Ребрикова¹, П.Е. Ермолаева³, Я.Б. Бейкин^{1,2}

¹ ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр имени Я.Б. Бейкина», Екатеринбург, Россия

² ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

³ ГАУЗ СО «Центральная городская клиническая больница № 23 город Екатеринбург», Екатеринбург, Россия

Резюме. Введение. В России в условиях проведения скрининга рака шейки матки при помощи цитологического метода исследования становится актуальной проблема контроля качества. При этом необходимо стандартизировать методику сопоставления результатов морфологических методов. Цель исследования – сопоставление результатов цитологических и гистологических исследований при диагностике патологии шейки матки с последующей классификацией несоответствий и расчетом показателей эффективности цитологического метода.

Материалы и методы. Проведен сравнительный ретроспективный анализ цитологического исследования с последующим гистологическим исследованием у 2739 пациенток.

Результаты. Совпадения обоих методов были определены в 57,9% случаев, незначительное несоответствие в 29%, значительное несоответствие в 13,1%. Чувствительность цитологического метода составила 79,3%, специфичность 77,6%, положительная прогностическая ценность 80%, отрицательная прогностическая ценность 76,9%. Число истинно положительных результатов статистически значимо было выше при использовании метода жидкостной цитологии, в то время как число ложно отрицательных результатов оказалось ниже по сравнению с традиционным методом. Наибольший процент истинно положительных результатов и наименьший ложно отрицательных выявлен при интервале между цитологическим и гистологическим исследованием до 2 месяцев.

Заключение. Сопоставление результатов морфологических методов – наилучший вариант обеспечения контроля качества. Это должен быть задокументированный и регламентированный протокол с последующим пересмотром препаратов при наличии расхождений и анализом причин несоответствий, а также расчетом эффективности метода.

Ключевые слова: цито-гистологическое сопоставление, интраэпителиальное поражение шейки матки, рак шейки матки, цервикальный скрининг, контроль качества

Для корреспонденции: Мария Игоревна Пахарукова. E-mail: pakharukovami@gmail.com

Для цитирования: Пахарукова М.И., Лысак Е.Е., Рыжанкова К.В., Котугина М.А., Ребрикова Л.Н., Ермолаева П.Е., Бейкин Я.Б. Практический опыт применения цито-гистологической корреляции как способ обеспечения контроля качества исследований при диагностике патологии шейки матки. Клин. эксп. морфология. 2024;13(1):76–83. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.1.76-83.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ 122020900136-4).

Статья поступила 14.03.2023. Получена после рецензирования 17.04.2023. Принята в печать 20.06.2023.

Application of cyto-histological correlation as a quality control in diagnosing cervical pathology

M.I. Pakharukova^{1,2}, E.E. Lysak¹, K.V. Ryzhankova¹, M.A. Kotugina¹,
L.N. Rebrikova¹, P.E. Ermolaeva³, Ya.B. Beikin^{1,2}

¹ Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russia

² Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

³ Central City Clinical Hospital No. 23 of Yekaterinburg, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Introduction. In Russia, cervical cancer screening with cytological techniques faces a problem of quality control. Currently, it is necessary to standardize the methodology for comparing the results

of morphological methods. The aim of the paper was to compare the findings of cytological and histological studies when diagnosing cervical pathology, classify discrepancies, and evaluate the effectiveness of the cytological method.

Materials and methods. A comparative retrospective analysis of cytological examination followed by histological examination was carried out in 2,739 patients.

Results. Both methods showed coincidence in 57.9% of cases. Minor and major discrepancies were determined in 29% and 13.1% of cases, respectively. The cytologic technique showed the following figures: sensitivity of 79.3%, specificity of 77.6%, positive prognostic value of 80%, and negative predictive value of 76.9%. When using the liquid-based cytology method, the number of true positive results was significantly higher, while that of false negative results was lower. The interval of up to 2 months between cytological and histological examinations yielded the highest rate of true positive and the lowest rate of false negative results.

Conclusion. Comparing the results of morphological methods is most likely to be the best option for ensuring quality control of laboratory tests. This should be a guideline with a subsequent revision of samples in the presence of discrepancies, analysis of their causes, and evaluation of method effectiveness.

Keywords: cyto-histological correlation, intraepithelial lesion of the cervix, cervical cancer, cervical screening, quality control

Corresponding author: Maria I. Pakharukova. E-mail: pakharukovami@gmail.com

For citation: Pakharukova M.I., Lysak E.E., Ryzhankova K.V., Kotugina M.A., Rebrikova L.N., Ermolaeva P.E., Beikin Ya.B. Application of cyto-histological correlation as a quality control in diagnosing cervical pathology. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):76–83 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.76-83.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (No. 122020900136-4).

Received 14.03.2023. **Received in revised form** 17.04.2023. **Accepted** 20.06.2023.

Введение

Несмотря на доступность диагностики, рак шейки матки (РШМ) остается важной медицинской, социальной и экономической проблемой не только в России, но и в мире в целом. На территории Российской Федерации данная нозология занимает пятое место в структуре злокачественных новообразований у женщин. При этом тенденции к снижению выявляемости данной патологии не отмечается [1, 2]. В странах с высоким уровнем экономического развития внедрены программы массового скрининга женского населения с применением тестирования на вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) методом полимеразной цепной реакции. Преимущества данной методики в простоте получения материала с возможностью самозабора и высокой чувствительности метода. Однако по сравнению с цитологическим исследованием метод имеет более низкую специфичность и высокую себестоимость [3, 4]. Согласно приказу Минздрава России от 13.03.2019 № 124н «Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения» на территории страны действует программа скрининга рака шейки матки, реализуемая посредством цитологического исследования. Данный тест является недорогим, высокоспецифичным, но в то же время сильно зависит от уровня подготовки персонала и правильности проведения преаналитического этапа [3–5].

В России контроль качества цитологических исследований реализуется с помощью федеральной системы оценки качества, а также предложена модель внутреннего контроля качества, прописанная в ГОСТ 57005-2016 «Диагностика в онкологии. Скрининг. Рак шейки матки». Обе системы рекомендательны. При этом сопоставление результатов цитологического и гистологического методов (цитологическая корреляция) является одним из наиболее информативных способов обеспечения качества исследований [6]. Для стандартизации методики и возможности межлабораторного сравнения Коллегией американских патологов предложены система оценки сопоставления цито-гистологических пар, критерии включения образцов, а также рекомендации по предоставлению расхождений. Золотой стандарт – гистологическое исследование, которое имеет неоспоримые преимущества, хотя и обладает некоторыми недостатками, такими как субъективность при оценке гистологического материала и нарезке определенного участка патологом, а также правильный выбор участка шейки матки для получения биопсийного материала клиницистом [4]. Несоответствие между результатами цитологического и гистологического исследования предложено оценивать как незначительное или значительное с последующим пересмотром всех дискордантных пар [6–8].

Цель работы – сопоставление результатов цитологических и гистологических исследований при диагностике патологии шейки матки с последующей клас-

сификацией несоответствий и расчетом показателей эффективности цитологического метода.

Материалы и методы

Проведен сравнительный ретроспективный наблюдательный анализ результатов цитологического исследования 2739 мазков, взятых с шейки матки, традиционным методом (n=2297) и методом жидкостной цитологии (n=442), с последующей гистологической верификацией диагноза. Пациентки подписывали добровольное информированное согласие на обследование и проведение диагностических и хирургических процедур в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава России «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки». Исследование выполнено на базе государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Клинико-диагностический центр» в период с 2018 по 2021 год. Медиана возраста пациенток составила 38 лет (31; 47). Критерии включения: цитологическое исследование, предшествующее гистологическому; интервал между исследованиями не более 6 месяцев (медиана составила 56 дней [33; 88]); адекватность материала цитологического и гистологического препаратов.

Цитологические заключения даны в соответствии с терминологией Bethesda 2014. Гистологические заключения сформулированы согласно классификации опухолей женских репродуктивных органов (ВОЗ, 2019, 5-е издание). При сопоставлении заключений пары с идентичными диагностическими категориями были оценены как соответствие, расхождения – как незначительные и значительные несоответствия. Для расчета показателей эффективности цитологического метода в диагностике патологии шейки матки все результаты сопоставлений были также классифицированы по категориям: ИП (истинно положительный); ИО (истинно отрицательный), ЛП (ложно положительный); ЛО (ложно отрицательный). Обе системы сопоставления заключений представлены в таблице 1. Произведен расчет показателей эффективности цитологического метода по формулам [9]:

$$Se \text{ (чувствительность)} = [ИП / ИП + ЛО] \times 100\%$$

$$Sp \text{ (специфичность)} = [ИО / ИО + ЛП] \times 100\%$$

$$PPV \text{ (положительная прогностическая ценность)} = \\ = [ИП / ИП + ЛП] \times 100\%$$

$$NPV \text{ (отрицательная прогностическая ценность)} = \\ = [ИО / ИО + ЛО] \times 100\%$$

При расхождении результатов цитологического и гистологического методов более чем в одну степень дисплазии все доступные цитологические препараты были пересмотрены.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.8 (ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия χ^2 Пирсона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Согласно проведенному исследованию, значительные несоответствия выявлены в 13,1% случаев (n=359), незначительные несоответствия составили 29% (n=794). Совпадение результатов обоих методов обнаружено в 57,9% случаев (n=1586). В соответствии с классификацией результатов по категориям получены следующие данные: ИП – 40,7% (n=1116), ИО – 26,2% (n=717), ЛО – 17,5% (n=478), ЛП – 15,6% (n=428). Результаты сопоставления согласно обеим классификациям и число случаев в каждой из анализируемых групп представлены в таблице 1.

При расчете показателей эффективности цитологического метода исследования получены следующие результаты: Se (CIN 2+) = 79,3%, Sp (CIN 2+) = 77,6%, PPV (CIN 2+) = 80%, NPV (CIN 2+) = 76,9%.

При анализе сопоставления результатов в зависимости от метода цитологического исследования выявлено, что число истинно положительных результатов статистически значимо было выше при использовании метода жидкостной цитологии, в то время как число ложно отрицательных результатов было ниже ($p < 0,001$). В категориях совпадения и несоответствий не было выявлено статистически значимых отличий ($p = 0,551$). Результаты представлены в таблице 2.

Таким образом, для традиционного метода цитологического исследования Se (CIN 2+) составила 75,9%, Sp (CIN 2+) = 82,4%, PPV (CIN 2+) = 80,9%, NPV (CIN 2+) = 77,8%. Расчеты показателей эффективности для метода жидкостной цитологии: Se (CIN 2+) = 91,9%, Sp (CIN 2+) = 34,4%, PPV (CIN 2+) = 77,5%, NPV (CIN 2+) = 63,3%.

При цито-гистологическом сопоставлении в зависимости от интервала между исследованиями наибольший процент истинно положительных результатов и наименьший ложно отрицательных был выявлен при интервале до 2 месяцев. Различия показателей статистически значимы ($p = 0,001$) (табл. 3).

Для анализа ошибок интерпретации при первичной оценке цитологических препаратов был проведен пересмотр стекол с несоответствиями результатов между цитологическим и гистологическим методами исследования (555 случаев). В категории ложно отрицательных результатов (n=287) в 37% случаев допущена ошибка интерпретации клеточных изменений (гиподиагностика). В категории ложно положительных результатов (n=268) погрешность интерпретации отмечалась в 13% случаев (гипердиагностика).

Таблица 1 | Table 1

Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов исследования при диагностике патологии шейки матки | Comparison of the results of cytological and histological evaluations in cervical pathology diagnosis

Цитологическое заключение Cytological diagnosis N (%)	Гистологическое заключение Histological diagnosis				
	без патологии negative for SIL and cancer N (%)	LSIL N (%)	HSIL (CIN I–II, II) N (%)	HSIL (CIN II–III, III, CIS) N (%)	SCC N (%)
NILM 1066 (38,9)	646 (59,2) C, ИО C, TN	260 (43,1) НН, ЛО MD, FN	121 (27,2) ЗН, ЛО SD, FN	32 (8,8) ЗН, ЛО SD, FN	7 (3,0) ЗН, ЛО SD, FN
ASCUS 111 (4,1)	70 (6,4) C, ИО C, TN	22 (3,6) C, ИП	14 (3,1) НН, ИП	5 (1,4) НН, ЛО	0 (0,0) ЗН, ЛО SD, FN
LSIL 574 (21,0)	222 (20,3) НН, ЛП MD, FP	217 (36,0) C, ИП C, TP	99 (22,2) НН, ИП MD, TP	29 (8,0) НН, ЛО MD, FN	7 (3,0) НН, ЛО MD, FN
ASC-H 55 (2,0)	12 (1,1) ЗН, ЛП SD, FP	6 (1,0) НН, ЛП MD, FP	16 (3,6) C, ИП C, TP	10 (2,8) C, ИП C, TP	11 (4,6) НН, ИП MD, TP
HSIL (CIN I–II, II) 334 (12,2)	82 (7,5) ЗН, ЛП SD, FP	57 (9,5) НН, ИП MD, TP	111 (24,9) C, ИП C, TP	72 (19,9) C, ИП C, TP	12 (5,1) НН, ЛО MD, FN
HSIL (CIN II–III, III, CIS) 375 (13,7)	50 (4,6) ЗН, ЛП SD, FP	29 (4,8) НН, ЛП MD, FP	77 (17,3) C, ИП C, TP	175 (48,3) C, ИП C, TP	44 (18,6) НН, ИП MD, TP
SCC 224 (8,2)	10 (0,9) ЗН, ЛП SD, FP	12 (2,0) ЗН, ЛП SD, FP	7 (1,6) НН, ЛП MD, FP	39 (10,8) НН, ИП MD, TP	156 (65,8) C, ИП C, TP

C – совпадение, НН – незначительное несоответствие, ЗН – значительное несоответствие, ИП – истинно положительный, ЛО – ложно отрицательный, ЛП – ложно положительный, ИО – истинно отрицательный; NILM – интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы отсутствуют, CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия, LSIL – интраэпителиальное поражение низкой степени, HSIL – интраэпителиальное поражение высокой степени, SCC – инвазивная плоскоклеточная карцинома, ASC – клетки плоского эпителия с атипией неясного значения, ASCUS – вероятнее LSIL, ASC-H – вероятнее HSIL
C – coincidence, MD – minor discrepancy, SD – significant discrepancy, TP – true positive, FN – false negative, FP – false positive, TN – true negative; NILM – no intraepithelial changes or malignant processes, CIN – cervical intraepithelial neoplasia, LSIL – low-grade intraepithelial lesion, HSIL – high-grade intraepithelial lesion, SCC – invasive squamous cell carcinoma, ASC – atypical squamous epithelial cells of undetermined significance, ASCUS – most likely LSIL, ASC-H – most likely HSIL

Таблица 2 | Table 2

Сопоставления результатов в зависимости от метода цитологического исследования | Comparison of the results depending on the cytological method

Результаты сопоставления Results	Метод исследования Cytological method		P
	традиционный traditional N (%)	жидкостный liquid-based N (%)	
Совпадение Coincidence	1334 (58,1%)	252 (57,0%)	0,551
Незначительное несоответствие Minor discrepancy	669 (29,1%)	125 (28,3%)	
Значительное несоответствие Significant discrepancy	294 (12,8%)	65 (14,7%)	

Таблица 2 (окончание) | Table 2 (end)

Результаты сопоставления Results	Метод исследования Cytological method		P
	традиционный traditional N (%)	жидкостный liquid-based N (%)	
Истинно отрицательный True negative	685 (29,8)	32 (7,2)	<0,001*
Истинно положительный True positive	836 (36,4)	280 (63,3)	
Ложно отрицательный False negative	439 (19,1)	39 (8,8)	
Ложно положительный False positive	337 (14,7)	91 (20,6)	

* различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

* differences are statistically significant ($p < 0.05$)

Таблица 3 | Table 3

Анализ сопоставления результатов в зависимости от интервала между цитологическим и гистологическим методом исследования | Comparing the results depending on the interval between the cytological and histological studies

Результат Result	Интервал Interval			P
	менее 2 месяцев <2 months N (%)	2–4 месяца 2–4 months N (%)	4–6 месяцев 4–6 months N (%)	
Истинно отрицательный True negative	374 (25,2)	268 (28,0)	75 (25,3)	0,001*
Истинно положительный True positive	655 (44,1)	347 (36,3)	114 (38,5)	
Ложно отрицательный False negative	224 (15,1)	197 (20,6)	57 (19,3)	
Ложно положительный False positive	233 (15,7)	145 (15,2)	50 (16,9)	

* различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

* differences are statistically significant ($p < 0.05$)

Обсуждение

Система оценки и категории сопоставления результатов цито-гистологических пар, предложенная Коллегией американских патологов, представляет собой понятный и доступный алгоритм действий [4, 6, 7]. Сегодня гистологическое исследование не может считаться настоящим золотым стандартом, поскольку имеет ряд существенных ограничений и вариабельность интерпретации между патологами [10, 11]. От качества забора материала зависит итоговая результативность гистологического диагноза [12]. По итогам сопоставления результатов цито-гистологических пар совпадение заключений обоих методов составило 57,9%. Незначительные несоответствия были обнаружены в 29% случаев, категория значительных несоответствий составила 13,1%. Согласно проведенным ранее иссле-

дованиям, показатели для данных категорий варьируют в диапазоне 46,74–73%, 18,8–46%, и 6,4–7,6%, соответственно [5, 8, 13]. В первых двух категориях полученные нами результаты соответствуют общим тенденциям, однако число значительных расхождений превышает средние значения.

При расчете показателей эффективности цитологического метода Se для традиционной цитологии составила 75,9%, Sp – 82,4%. Наши данные сопоставимы с данными других исследователей, согласно которым Se для традиционного метода составляет диапазон от 42,2 до 87,2%, а Sp – от 69,2 до 99,4% [13–17]. Показатели эффективности для жидкостной цитологии: Se – 91,1%, Sp – 34,4%. Аналогичные параметры для чувствительности метода согласно данным литературы составляют от 36,7 до 83,4%; для специфичности – от

38,3 до 99,5% [14–18]. В нашем исследовании показатель чувствительности оказался выше общемировых значений, а специфичности, наоборот, ниже. По результатам сопоставления процент ложно положительных результатов был выше при методе жидкостной цитологии (20,6%) по сравнению с традиционным методом (14,7%). Вероятнее всего, эти различия связаны с выборкой обследуемых пациенток, поскольку исследование методом жидкостной цитологии в клинко-диагностическом центре имени Я.Б. Бейкина проводят преимущественно пациенткам с подозрением на патологию шейки матки, а также отсутствием возможности корректировки гистологического заключения. Стоит отметить, что результаты цитологии подтверждались параллельным обнаружением ДНК ВПЧ ВКР в повышенной концентрации. Число истинно отрицательных результатов значительно меньше в результате исследования жидкостной цитологии по сравнению с традиционным методом (7,2 против 29,8%), так как в большинстве случаев при отрицательном результате цитологии и отсутствии ДНК ВПЧ не показано выполнение биопсии. Указанные причины могли привести к полученной более низкой специфичности для метода жидкостной цитологии по сравнению с традиционной.

В руководстве по алгоритму цито-гистологической корреляции [4–8] авторы предлагают рассчитывать показатель PPV для уменьшения доли ложно положительных результатов цитологии и контроля качества гистологического метода, особенно при малых образцах биопсийного материала. Сегодня не существует строгих общепринятых рамок для данного показателя, однако проведенные ранее исследования продемонстрировали, что PPV, как правило, составляет от 60 до 95%. Королевский колледж патологов Австралии установил стандарт $\geq 65\%$ для CIN 2+ [19–21]. Данный показатель по результатам нашего исследования составляет 80% (для традиционной цитологии – 80,9%, для метода жидкостной цитологии – 77,5%).

Все препараты с расхождениями, полученные в ходе сопоставления, рекомендовано пересматривать ретроспективно, как минимум двумя специалистами или ведущими сотрудниками для анализа ошибок, связанных с интерпретацией цитологической картины [4, 7, 8]. Для достижения данной цели необходимо длительное хранение всех цитологических препаратов, в том числе без выявленной патологии (NILM). В лаборатории цитологии клинко-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина при двухступенчатом просмотре препаратов все препараты, просмотренные фельдшером-лаборантом, сохраняются в течение 6 месяцев, а препараты, просмотренные врачом или биологом, в течение 1 года. Таким образом, при ретроспективной цито-гистологической корреляции каждые 6 месяцев нами пересматриваются все препараты с расхождениями относительно цитологии. Результаты пересмотра заносятся в базу данных для последующего анализа в конце отчетного периода. В нашем исследовании пересмотр расхождений был

возможен в 555 случаях, поскольку практика системного каталогизирования результатов пересмотров была внедрена в 2020 году. В категории ложно отрицательных результатов ($n=287$) в 37% случаев была допущена цитологическая гиподиагностика клеточных изменений. В категории ложно положительных результатов ($n=268$) погрешность интерпретации отмечалась в 13% случаев (гипердиагностика). В большинстве рассмотренных несоответствий цитологическое заключение осталось прежним.

Следует отметить, что на сопоставимость результатов в значительной степени влияет интервал между проведенными исследованиями. Чем он больше, тем меньше вероятность совпадения. Оптимальным оказался временной интервал, не превышающий 2 месяца. Согласно ранее проведенным исследованиям, большинство авторов также приходят к выводу о предпочтительном интервале между цито-гистологическим исследованием от 2–3 месяцев и не более 6 месяцев во избежание несоответствий из-за регресса или прогресса поражения [4–8].

Преимуществами проведенного нами исследования можно считать достаточно крупную и репрезентативную когорту обследованных пациенток (2739 случаев), а также подробный анализ расхождений в зависимости от цитологического метода и интервала между исследованиями. Ограничением нашего исследования являлось отсутствие возможности пересмотра гистологических препаратов и получения дополнительных срезов материала для исключения ошибки на этапе гистологического исследования. Таким образом, диагноз, установленный на основании биопсии, был окончательным при сопоставлении результатов. Отметим, что критерии оценки результатов согласно категориям ИП, ЛО, ЛО, ЛП не регламентированы. Отсутствие стандартизации данных категорий может влиять на межлабораторное сравнение показателей эффективности цитологического метода, и данный вопрос требует дальнейшего рассмотрения. Также цито-гистологическое сопоставление можно было бы сделать эффективнее, включив дополнительные методы обследования, такие как иммуноцитохимическое (p16/ki67) или иммуногистохимическое (p16).

Заключение

Сопоставление результатов цитологического и гистологического методов – наилучший вариант обеспечения контроля качества лабораторных исследований при диагностике патологии шейки матки. Данный процесс может быть адаптирован под ресурсы лаборатории, возможности персонала и рабочего процесса. Это должен быть задокументированный и регламентированный протокол с последующим пересмотром препаратов при наличии расхождений и анализом причин несоответствий, а также расчетом эффективности метода. Пересмотр несоответствий позволит проработать ошибки интерпретации при просмотре препаратов

или выявить погрешности преаналитического метода. Таким образом, данная работа может существенно улучшить ситуацию со своевременным выявлением и лечением рака шейки матки, а также интраэпителиальных изменений, предшествующих ему.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.И. Пахарукова.
Сбор и обработка материала – М.И. Пахарукова, Е.Е. Лысак, К.В. Рыжанкова, М.А. Котугина, Л.Н. Ребрикова, П.Е. Ермолаева.
Написание текста – М.И. Пахарукова, Е.Е. Лысак, К.В. Рыжанкова, М.А. Котугина, Л.Н. Ребрикова.
Редактирование – Я.Б. Бейкин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.I. Pakharukova.
Collected the data and performed the analysis – M.I. Pakharukova, E.E. Lysak, K.V. Ryzhankova, M.A. Kotugina, L.N. Rebrikova, P.E. Ermolaeva.
Wrote the paper – M.I. Pakharukova, E.E. Lysak, K.V. Ryzhankova, M.A. Kotugina, L.N. Rebrikova.
Edited the manuscript – Ya.B. Beikin.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2022. 252 с.
AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). Malignant neoplasms in Russia in 2021 (incidence and mortality). Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2022. 252 p. (In Russ.).
2. The WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds.). WHO classification of tumours. Female genital tumours. V. 4. 5th ed. Lyon: IARC, 2020. 632 p.
3. Ouh YT, Park JJ, Kang M, Kim M, Song JY, Shin SJ et al. Discrepancy between cytology and histology in cervical cancer screening: a multicenter retrospective study (KGOG 1040). J Korean Med Sci. 2021;36(24):e164. DOI: 10.3346/jkms.2021.36.e164.
4. Crothers BA. Cytologic-histologic correlation: where are we now, and where are we going? Cancer Cytopathol. 2018;126(5):301–8. DOI: 10.1002/cncy.21991.
5. Asaturova A, Dobrovol'skaya D, Magnaeva A, Tregubova A, Bayramova G, Sukhikh G. Cervical cytology–histology correlation based on the American Society of Cytopathology Guideline (2017) at the Russian National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. Diagnostics (Basel). 2022;12(1):210. DOI: 10.3390/diagnostics12010210.
6. Birdsong GG, Walker JW. Gynecologic cytology-histology correlation guideline. J Am Soc Cytopathol. 2017;6(2):8–13. DOI: 10.1016/S2213-2945(17)30022-4.
7. Crothers BA, Jones BA, Cahill LA, Moriarty AT, Mody DR, Tench WD et al. Quality improvement opportunities in gynecologic cytologic-histologic correlations: findings from the College of American Pathologists Gynecologic Cytopathology Quality Consensus Conference working group 4. Arch Pathol Lab Med. 2013;137(2):199–213. DOI: 10.5858/arpa.2012-0250-OA.
8. Gupta R, Hariprasad R, Dhanasekaran K, Sodhani P, Mehrotra R, Kumar N et al. Reappraisal of cytology-histology correlation in cervical cytology based on the recent American Society of Cytopathology Guidelines (2017) at a Cancer Research Centre. Cytopathology. 2020;31(1):53–8. DOI: 10.1111/cyt.12774.
9. Пахарукова М.И., Котугина М.А., Вайнберг Э.И. Анализ сопоставления результатов цитологического и гистологического методов в диагностике злокачественных новообразований вульвы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):41–49. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.41-49.
Pakharukova MI, Kotugina MA, Vainberg EI. Analyzing the differences between the cytological and histological methods in the vulva malignant neoplasm diagnosis. Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):41–49 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.41-49.
10. Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, Olsen CH, Miyazawa K, O'Connor DM. Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. Obstet Gynecol. 2002;100(2):277–80. DOI: 10.1016/s0029-7844(02)02058-6.
11. Cai B, Ronnett BM, Stoler M, Ferenczy A, Kurman RJ, Sadow D et al. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. Am J Surg Pathol. 2007;31(12):1854–60. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318058a544.
12. Abdul-Karim FW, Yang B. Cytologic-histologic discrepancies in pathology of the uterine cervix: Analysis of the clinical and pathologic factors. Adv Anat Pathol. 2017;24(5):304–9. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000165.
13. Аттеева Д.И., Асатурова А.В., Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Стародубцева Н.Л., Шешко П.Л. и др. Сопоставление результатов клинических и морфологических методов исследований при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях шейки матки (ретроспективное исследование). Гинекология. 2021;23(1):78–82. DOI: 10.26442/20795696.2021.1.200647.
Attoeva DI, Asaturova AV, Nazarova NM, Prilepskaya VN, Starodubtseva NL, Sheshko PL et al. Comparison of the results of clinical and morphological methods of research in HPV-associated diseases of the cervix (retrospective study). Gynecology. 2021;23(1):78–82 (In Russ.). DOI: 10.26442/20795696.2021.1.200647.
14. Liang LA, Einzmann T, Franzen A, Schwarzer K, Schauburger G, Schriefer D et al. Cervical cancer screening: comparison of conventional pap smear test, liquid-based cytology, and human papillomavirus testing as stand-alone or cotesting strategies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2021;30(3):474–84. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-20-1003.
15. Li L, Zheng Z, Li L. Evaluation of human-papillomavirus screening for cervical cancer in China's rural population. PeerJ. 2019;7:e8152. DOI: 10.7717/peerj.8152.

16. *Kamineni V, Nair P, Deshpande A.* Can LBC completely replace conventional Pap smear in developing countries. *J Obstet Gynaecol India.* 2019;69(1):69–76. DOI: 10.1007/s13224-018-1123-7.
17. *Aydogan Kirmizi D, Baser E, Demir Caltekin M, Onat T, Sahin S, Yalvac ES.* Concordance of HPV, conventional smear, colposcopy, and conization results in cervical dysplasia. *Diagn Cytopathol.* 2021;49(1):132–9. DOI: 10.1002/dc.24655.
18. *Das D, Sengupta M, Basu K, Tirkey M, Datta C, Chatterjee U.* Role of p16/Ki-67 dual immunostaining in detection of cervical cancer precursors. *J Cytol.* 2018;35(3):53–158. DOI: 10.4103/JOC.JOC_4_17.
19. *Ince U, Aydin O, Peker O.* Clinical importance of “low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H)” terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):152–6. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.12.004.
20. *Castle PE, Cox JT, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D.* Factors influencing histologic confirmation of high-grade squamous intraepithelial lesion cytology. *Obstet Gynecol.* 2008;112(3):637–45. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181834637.
21. *Shield PW, Finnimore J, Cummings M, Wright RG.* Performance measures for Australian laboratories reporting cervical cytology: a decade of data 1998–2008. *Pathology.* 2010;42(7):623–8. DOI: 10.3109/00313025.2010.520308.

Информация об авторах

Мария Игоревна Пахарукова – биолог лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина, младший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Егор Евгеньевич Лысак – заведующий лабораторией цитологии Клинико-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина.

Ксения Вячеславовна Рыжанкова – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина.

Мария Александровна Котугина – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина.

Лариса Николаевна Ребрикова – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра имени Я.Б. Бейкина.

Полина Евгеньевна Ермолаева – врач клинической лабораторной диагностики Центральной городской клинической больницы № 23 Екатеринбург.

Яков Борисович Бейкин – доктор биологических наук, профессор, главный врач Клинико-диагностического центра Екатеринбург, заведующий лабораторией иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Author information

Mariia I. Pakharukova – Biologist, Cytological Laboratory, Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center; Junior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

<https://orcid.org/0000-0001-6019-3463>

Egor E. Lysak – Head of Cytological Laboratory, Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0009-0002-1743-967X>

Ksenia V. Ryzhankova – Cytologist, Cytological Laboratory, Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0009-0008-2502-4590>

Maria A. Kotugina – Cytologist, Cytological Laboratory, Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0000-0001-6728-4501>

Larisa N. Rebrikova – Cytologist, Cytological Laboratory, Ya.B. Beikin Clinical and Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0000-0002-9283-3282>

Polina E. Ermolaeva – Cytologist, Central City Clinical Hospital No. 23 of Yekaterinburg.

<https://orcid.org/0000-0002-8809-7577>

Yakov B. Beikin – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Clinical and Diagnostic Center of Yekaterinburg; Head of the Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

<https://orcid.org/0000-0001-8622-1602>

II Российский конгресс лабораторной гистотехнологии с международным участием

22–23 марта 2024 года

г. Москва

22–23 марта 2024 года в Москве на базе городской клинической больницы им. С.С. Юдина прошел II Российский конгресс лабораторной гистотехнологии с международным участием. В нем приняли участие более 400 специалистов из разных регионов Российской Федерации, а также спикеры из Китайской Народной Республики. Открыл конгресс главный врач ГКБ им. С.С. Юдина – доктор медицинских наук профессор В.Н. Галкин. Участников приветствовали президент Ассоциации специалистов в области лабораторной гистотехнологии, председатель аккредитационной комиссии специалистов со средним медицинским образованием Т.Ю. Юнусов, президент Российского общества патологоанатомов, главный внештатный специалист ФМБА России профессор Ф.Г. Забозлаев, главный специалист по патологической анатомии Департамента здравоохранения города Москвы, заведующий кафедрой

патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова профессор О.В. Зайратьянц, научный руководитель НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского член-корреспондент РАН Л.В. Кактурский, заведующая Центром патологоанатомической диагностики и молекулярной генетики ГКБ им. С.С. Юдина А.Б. Семенова.

В рамках программы с докладами выступили ведущие эксперты по патологической анатомии, а также специалисты направлений, неразрывно связанных с патологоанатомическими исследованиями.

Конгресс включал в себя также мастер-классы, занятия с разбором ошибок и артефактов в работе лаборантов, заслушивание отчета и планов работы Ассоциации в области лабораторной гистотехнологии, вручение премий за вклад в развитие гистотехнологии.

XIV пленум Российского общества патологоанатомов

24–25 мая 2024 года

г. Уфа

24–25 мая 2024 года в Уфе на базе Башкирского государственного медицинского университета Минздрава России состоится XIV пленум Российского общества патологоанатомов. Основной вопрос программы пленума – роль патологоанатомической службы в реализации приоритетных направлений развития здравоохранения Российской Федерации.

В числе обсуждаемых проблем будут вопросы развития и внедрения инновационных методов патологоанатомической диагностики, участия службы в контроле качества оказания медицинской помощи, внедрения информационных технологий, управления развитием патологической анатомии, совершенствования нормативно-правовой базы службы.