

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 13 | № 3 | 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

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

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

Ельчанинов А.В., доктор мед. наук,
доцент, 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 **3** | 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 Secretary

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

Elchaninov, Andrey V., Dr. Sci. Med.,
Associate 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

Savelyev, 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.

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ
REVIEWS

- Л.В. Волкова, А.В. Батищев, Л.М. Михалева* 5 *L.V. Volkova, A.V. Batishchev, L.M. Mikhaleva*
Исследование патологии желудка
с использованием методов искусственного
интеллекта для анализа данных микроскопии
Studying gastric pathologies using artificial intelligence
to analyze microscopy data

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH

- В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский,
Р.Е. Лахин, С.Г. Григорьев* 16 *V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky,
R.E. Lakhin, S.G. Grigoriev*
Особенности изменения гидродинамического
сопротивления в сосудах микроциркуляторного
русла легких при COVID-19 по результатам
морфометрического исследования
Features of hydrodynamic resistance in the vessels of
microvasculature in the lungs during COVID-19 –
morphometric study results
- Л.М. Сомова, С.А. Абрамова, Е.И. Дробот,
Е.В. Пустовалов, И.Н. Ляпун, М.Ю. Шелканов* 26 *L.M. Somova, S.A. Abramova, E.I. Drobot,
E.V. Pustovalov, I.N. Lyapun, M.Yu. Shchelkanov*
Нейтрофильные синцитии в периферической
крови пациентов с коронавирусной инфекцией
(COVID-19)
Neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients
with coronavirus infection (COVID-19)
- А.Е. Прощина, А.С. Харламова, Ю.С. Кривова,
О.С. Годовалова, С.В. Савельев* 34 *A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova, Yu. S. Krivova,
O.S. Godovalova, S.V. Saveliev*
Формирование транзиторных зон
в дорсомедиальной и дорсолатеральной
неокортикальных областях в раннем развитии
человека
Delineation of transient zones in dorsolateral and
dorsomedial neocortical areas in early human
development
- И.А. Куликов, К.А. Артемьева, А.П. Алексанкин,
Е.Р. Милютина, И.И. Степанова, Н.В. Низяева,
Л.М. Михалева* 42 *I.A. Kulikov, K.A. Artemyeva, A.P. Aleksankin,
E.R. Milyutina, I.I. Stepanova, N.V. Nizyaeva,
L.M. Mikhaleva*
Морфофункциональные, молекулярные
и иммунологические изменения в плаценте
и периферической крови при патологическом
прикреплении плаценты
Placental and peripheral blood changes in functional
morphology and immunology in patients with placenta
accreta spectrum
- А.А. Нестерова, А.О. Довгалева, И.И. Прокофьев,
В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков* 53 *A.A. Nesterova, A.O. Dovgalev, I.I. Prokofiev,
V.N. Perfilova, I.N. Tyurenkov*
Морфометрический анализ сетчатки глаза крыс
при хроническом стрессе в условиях измененной
иммунореактивности
Retinal morphometric analysis of the chronically
stressed rats with altered immunoreactivity

*Д.К. Соколов, Г.М. Казанская, А.М. Волков,
А.В. Строкотова, Е.Э. Кливер, Э.В. Григорьева,
С.В. Айдагулова*
Гистологические и иммуногистохимические
изменения префронтальной коры головного мозга
мышей под действием дексаметазона

61 *D.K. Sokolov, G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov,
A.V. Strokotova, E.E. Kliver, E.V. Grigorieva,
S.V. Aidagulova*
Histological and immunohistochemical changes
in mouse prefrontal cortex exposed to dexamethasone

*Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина,
А.А. Сапрыкина, Я.А. Гушин,
М.Н. Макарова*
Оценка экспрессии эндотелиальных и некоторых
маркеров воспаления в экспериментальной модели
острого респираторного дистресс-синдрома

70 *Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina,
A.A. Saprykina, Ya.A. Gushchin,
M.N. Makarova*
Evaluation of the expression of endothelial and some
inflammation markers in an experimental acute
respiratory distress syndrome model

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

Е.А. Дубова, М.А. Шехтер, К.А. Павлов
Плоскоклеточная карцинома поджелудочной
железы: два клинических наблюдения

79 *E.A. Dubova, M.A. Shehter, K.A. Pavlov*
Squamous cell carcinoma of the pancreas:
two case reports

З.В. Гюева
Особенности течения новой коронавирусной
инфекции у пациентки с ревматоидным артритом
и системным АА амилоидозом. Клиническое
наблюдение

85 *Z.V. Gioeva*
Characteristics of the clinical course of the new
coronavirus disease in a patient with rheumatoid
arthritis and systemic AA amyloidosis. Clinical
observation

ЮБИЛЕИ ANNIVERSARIES

Вячеслав Семенович Пауков
(к 90-летию со дня рождения)

92 Vyacheslav Semenovich Paukov
on his 90th birthday

Исследование патологии желудка с использованием методов искусственного интеллекта для анализа данных микроскопии

Л.В. Волкова¹, А.В. Батищев¹, Л.М. Михалева²

¹ НОЧУ ВО Московский финансово-промышленный университет «Синергия», Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. Рак желудка (РЖ) – онкологическое заболевание, характеризующееся высокой заболеваемостью и смертностью, нередко диагностируемое на поздних стадиях. В связи с этим проблема ранней диагностики предопухоловой патологии и карцином желудка является крайне актуальной. Исследования, направленные на совершенствование диагностики, выявление объективных предиктивных и прогностических критериев, имеют не только важнейшее практическое значение, они позволяют уточнить этапы желудочного канцерогенеза, верифицировать значимость отдельных патологических изменений в слизистой оболочке желудка. В последние годы для решения практических и теоретических задач при оценке предраковых и неопластических процессов в эпителии желудка применяются как традиционные морфологические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические методы, так и методы интеллектуального анализа данных. В работе приводится обзор научных публикаций, освещающих проблему использования методов искусственного интеллекта, которые представлены в базе PubMed за 2017–2024 годы. Проведена оценка возможностей и перспектив использования искусственного интеллекта при изучении фоновых, предраковых и неопластических процессов в эпителии желудка, на основе данных, полученных в основном с помощью традиционных методов световой микроскопии.

Ключевые слова: интеллектуальный анализ данных, искусственный интеллект, рак желудка, морфология, фоновые и предраковые изменения, неопластические процессы

Для корреспонденции: Лариса Владимировна Волкова. E-mail: volkova16@gmail.com

Для цитирования: Волкова Л.В., Батищев А.В., Михалева Л.М. Исследование патологии желудка с использованием методов искусственного интеллекта для анализа данных микроскопии. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):5–15. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.5-15.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках негосударственного финансирования.

Статья поступила 28.02.2024. Получена после рецензирования 11.03.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Studying gastric pathologies using artificial intelligence to analyze microscopy data

L.V. Volkova¹, A.V. Batishchev¹, L.M. Mikhaleva²

¹ Moscow Financial and Industrial University “Synergy”, Moscow, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

Abstract. Gastric cancer (GC) has high morbidity and mortality and is often diagnosed at late stages. Thus, early diagnosis of precancerous pathologies and gastric carcinomas is highly relevant. The studies aimed at improving the diagnosis and identifying objective predictive and prognostic criteria are of great practical significance and make it possible to clarify the stages of gastric carcinogenesis, verify the significance of individual pathological changes in the gastric mucosa. In recent years, researchers have used both traditional and modern methods to solve practical and theoretical problems in assessing precancerous and neoplastic processes in the gastric epithelium. The former group includes morphological and immunohistochemical methods as well as molecular genetic techniques. The latter group encompasses data mining and AI.

The paper provides an overview of scientific publications covering the problem of using artificial intelligence methods, which are presented in the PubMed database for 2017–2024.

We assessed future possible uses of AI when studying background, precancerous, and neoplastic processes in the gastric epithelium. The data obtained mainly with traditional methods of light microscopy were used.

Keywords: data mining, artificial intelligence, gastric cancer, morphology, background and precancerous changes, neoplastic processes

Corresponding author: Larisa V. Volkova. E-mail: volkova16@gmail.com

For citation: Volkova L.V., Batishchev A.V., Mikhaleva L.M. Studying gastric pathologies using artificial intelligence to analyze microscopy data. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(3):5–15 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.5-15.

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

Received 28.02.2024. **Received in revised form** 11.03.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Рак желудка (РЖ) – онкологическое заболевание, характеризующееся высокой заболеваемостью и смертностью, нередко диагностируемое на поздних стадиях [1, 2]. В связи с этим высокостатистически значимой и актуальной проблемой является ранняя диагностика предопухоловой патологии и карцином желудка. Исследования, направленные на совершенствование диагностики, выявление предиктивных и прогностических критериев, имеют не только важнейшее практическое значение, они позволяют уточнить этапы желудочного канцерогенеза, верифицировать значимость отдельных патологических изменений в слизистой оболочке желудка. В последние годы для решения практических и теоретических задач при оценке предраковых и неопластических процессов в эпителии желудка используются как традиционные морфологические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические методы, так и методы искусственного интеллекта (ИИ). Целью данной работы была оценка применения и перспектив ИИ при исследовании фоновых, предраковых и неопластических процессов в эпителии желудка на основе результатов, полученных с помощью современных методов – радиологических, эндоскопических и, преимущественно, традиционной световой микроскопии [3–7]. ИИ имеет большой потенциал в качестве вспомогательного метода при оценке неоплазий и других патологий желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В настоящее время подходы ИИ, особенно машинное обучение и глубокое обучение, меняют весь спектр клинического лечения РЖ. Глубокое обучение – это подтип машинного обучения на основе многослойных нейронных сетей. При этом для создания различных моделей используются многомерные данные, включающие клиническую и другую информацию, изображения – эндоскопические, гистологические, радиологические, результаты компьютерной томографии (КТ), молекулярные биомаркеры и т.д. [6].

В гастроэнтерологии для оценки состояния пищеварительного тракта и диагностики опухолей ЖКТ применяется несколько методов визуализации – рентгенология, эндоскопия и гистологические исследования, а в автоматическом анализе изображений в основном задействовано машинное обучение [4, 7]. Указанные изображения можно считать и интерпретировать в разных клинических сценариях, к которым относятся обнаружение, классификация и автоматическая

сегментация опухолевых поражений, стратификация пациентов и прогнозирование ответа на лечение [4–9]. Предлагаются высокоэффективные модели глубокого обучения при исследовании нескольких органов (желудок, толстая кишка, легкие, молочная железа, лимфатические узлы) для выявления аденокарциномы в образцах биопсии и при радикальной лимфаденэктомии на целых срезах (WSI), что может быть полезно при скрининге и в рутинной патогистологической работе [9]. В задачи настоящего исследования входили систематизация и анализ актуальных научных публикаций, в которых применяются методы ИИ для оценки преимущественно морфологических данных, имеющихся в базе PubMed за период 2017–2024 годов, всего 98 публикаций, число которых с каждым годом возрастает: от одной статьи в 2017 году до 30 в 2022 году.

ИИ для оценки КТ-изображений при патологии желудка

Объектами для обучения нейронных сетей и распознавания патологических изменений в желудке являлись изображения, полученные с помощью компьютерной томографии [5–8, 10–12]. Н. Zhong et al. удалось создать модели на основе глубокого обучения с использованием КТ-изображений и клинических характеристик для прогнозирования ответа метастазов в лимфатических узлах на неоадьювантную химиотерапию при местнораспространенном раке желудка, что может дать ценную информацию для персонализированного лечения [10]. В многоцентровом исследовании S. Liu et al. модель ИИ на основе КТ-изображений и клинических данных характеризовалась способностью предоперационной идентификации экстранодальных метастазов в мягкие ткани, что может служить эффективным дополнением к предоперационной системе стадирования TNM [11]. Когортное исследование Y. Jiang et al. свидетельствует о том, что модель PMetNet на основе КТ-изображений может быть надежным неинвазивным методом для раннего выявления пациентов с клинически скрытыми метастазами в брюшину [12]. Перитонеальные метастазы являются частой патологией при РЖ, особенно у молодых пациентов на поздних стадиях развития опухоли, однако известны проблемы, связанные с ограниченным контрастированием мягких тканей, что приводит к плохой визуализации на КТ небольших опухолей брюшины, в связи с чем Z. Huang et al. применили методы глубокого обучения для анализа КТ-изображений первичной

опухоли на предоперационном этапе для диагностики перитонеальных метастазов при РЖ [5].

Анализ эндоскопических изображений с помощью методов ИИ

Методы ИИ используют для анализа и распознавания эндоскопических изображений [13–17]. Основное препятствие для применения машинного обучения в эндоскопии ЖКТ – отсутствие высококачественных изображений для обучения ИИ [4]. Классификация изображений с использованием ИИ разработана для количественной оценки глубины инвазии РЖ с чувствительностью 92,2%, а также для обнаружения локализации желудочно-кишечных кровотечений. М. Yin et al. использовали модель ИИ на основе эндоскопических изображений для идентификации перстневидно-клеточного РЖ [13]. М. Ma et al. исследовали возможность применения ИИ для диагностики поражений желудка в режиме реального времени на основе увеличивающих видео с оптическим усилением. Авторы установили, что, за исключением атрофии в сочетании с кишечной метаплазией и неоплазии низкой степени злокачественности, точность диагностики составила 0,90 [14]. Методы глубокого обучения для автоматической диагностики дисплазии желудка в эндоскопических образцах позволили отличить изменения регенерации эпителия желудка от дисплазии с классификацией последней. Модель DLDA выявляла категории: отсутствие дисплазии, дисплазия низкой и высокой степени, внутрислизистая инвазивная неоплазия [15]. Хронический атрофический гастрит – предопухоловое заболевание с низкой частотой выявления при эндоскопии, для его диагностики с использованием ResNet50 разработаны две модели ИИ: 1) диагностическая точность модели 1 для выявления атрофии антрального отдела желудка – 0,890, тяжести атрофии – 0,773 и 0,590; 2) точность модели 2 при диагностике хронического атрофического гастрита – от 0,854 [16]. W. Zheng et al. продемонстрировали высокую диагностическую точность метода ИИ для выявления *Helicobacter pylori* на основе эндоскопических изображений желудка [17].

Морфологические исследования патологии желудка с помощью ИИ

В современной гастроэнтерологии решение многих диагностических задач, подтверждение диагноза достигается с помощью методов световой микроскопии, иммуногистохимии, а в последние годы обеспечивается и применением цифровых и IT-технологий, при этом используются как цифровые изображения целых гистологических срезов, так и отдельных их фрагментов. Модели ИИ применяли для исследования различных патологий желудка и их клинико-морфологических характеристик: 1) гастритов типа А, В и С; 2) инфицированности *H. pylori* при окрашивании по Гимзе; 3) кишечной метаплазии; 4) дисплазии; 5) раннего рака желудка; 6) степени дифференцировки доброка-

чественных и злокачественных опухолей, различных гистотипов рака; 7) микроокружения при РЖ; 8) глубины инвазии рака; 9) предиктивных и прогностических факторов при РЖ, прогнозирования микросателлитной нестабильности по изображениям РЖ при окрашивании препаратов гематоксилином и эозином.

ИИ для диагностики фоновых и предопухоловых процессов в желудке

Для ускорения процесса обнаружения *H. pylori* в образцах биопсий на основе модели ИИ глубокого обучения S. Klein et al. разработали алгоритм, который можно применять к целым изображениям при окрашивании по Гимзе, а также гематоксилином и эозином. При окрашивании по Гимзе достигнута чувствительность 100% с приемлемой специфичностью – 66,2%. Разработанный алгоритм является чувствительным вариантом скрининга и может помочь патологам диагностировать наличие *H. pylori* в биоптатах желудка [18]. W.G.E. Gonçalves et al. на основе общедоступной коллекции гистопатологических изображений (DeerHP) и сверточной нейронной сети разработали модель ИИ для диагностики гастрита с использованием изображений биопсий слизистой оболочки желудка, инфицированной *H. pylori* [19].

Проблема хронического гастрита, фоновых и предопухоловых процессов в желудке в настоящее время является крайне актуальной, имеет высокую научную и практическую значимость [20, 21]. Для решения ее отдельных аспектов начинают использоваться методы ИИ [15, 16, 22].

Модель M. Iwaya et al. глубокой сверточной нейронной сети (DCNN) ResNet50 позволила классифицировать изображения с кишечной метаплазией (КМ) различной степени (от 0 до 3 баллов) с чувствительностью 97,7% и специфичностью 94,6%. ResNet50 имеет тенденцию пропускать небольшие очаги КМ, но успешно идентифицирует минимальные области КМ на препаратах при окрашивании гематоксилином и эозином, которые пропущены при исследовании патологами [22].

Хронический гастрит → РЖ кишечного типа – этапы наиболее распространенного пути канцерогенеза в желудке. Для верификации нормальной слизистой оболочки, хронического гастрита и РЖ кишечного типа В. Ma et al. разработали метод ИИ с использованием сверточной нейронной сети (CNN) на основе гистологических изображений целых срезов, нормализации окраски, DCNN и классификатора «случайного леса» [23]. Уровень точности для различения нормального эпителия → хронического гастрита → карциномы желудка достигал 94,5% [23].

Гистологическая диагностика карцином желудка с помощью ИИ

Ранняя патологоанатомическая диагностика рака желудка способствует повышению шансов пациента

на успешное лечение. Z. Song et al. разработана клинически применимая система ИИ для гистологической диагностики РЖ с использованием глубокого обучения с помощью DCNN, обученной на основе 2123 изображений целых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином (чувствительность – около 100%, средняя специфичность – 80,6%). Указанная модель ИИ может помочь патологоанатомам повысить точность диагностики, предотвратить ошибочные диагнозы. Наряду с этим она подтверждает возможность и преимущества использования ИИ для гистологической диагностики в повседневной практике [24]. Ранний РЖ имеет хороший прогноз, однако частота его диагностики неоптимальна вследствие неадекватного скрининга, скрытого характера ранних поражений. Диагностика РЖ на цветных изображениях не так информативна, как гиперспектральная визуализация, в связи с чем Y. Zhang et al. предложена модель ИИ, объединяющая микроскопическое гиперспектральное изображение с сетями глубокого обучения при диагностике предраковых поражений [25].

Для классификации изображений РЖ глубокое обучение применяли многие исследователи. В большинстве работ использовалась бинарная классификация карцином, что недостаточно с точки зрения клинических требований, точная верификация гистотипа РЖ важна для прогноза и лечения. В настоящее время появились научные публикации с использованием моделей ИИ, разработанных для мультиклассификации РЖ. В. Fu et al. описали метод мультиклассификации, основанный на глубоком обучении, имеющий высокую практическую ценность [26]. Разработана модель ИИ под названием StoHisNet на основе Transformer и CNN, которая может классифицировать общедоступные изображения набора данных желудка по четырем категориям: нормальная ткань, тубулярная, муцинозная и папиллярная аденокарцинома (АК). Точность, показатель F1, полнота и прецизионность предложенной модели в общедоступном наборе данных патологических изображений желудка составили 94,69, 94,96, 94,95 и 94,97%, соответственно. Н. J. Jang et al. разработали эффективные модели ИИ с применением глубокого обучения и полностью автоматизированного подхода для выявления дифференцированных/недифференцированных и немущинозных/мущинозных типов опухолей на целых изображениях тканей из набора данных АК Атласа генома рака (TCGA) (TCGA-STAD) [27]. При классификации небольших участков изображений опухолевых тканей можно определить относительную долю подтипов тканей РЖ и четко визуализировать их распределение. Классификатор тканей может быть полезным инструментом для количественного анализа срезов с опухолевой тканью, а комбинация классификаторов для различных молекулярных и морфологических вариантов РЖ может способствовать более эффективному выявлению гетерогенности опухолей. О. Iizuka et al. проведено обучение с использованием

CNN и рекуррентных нейронных сетей на целых гистологических изображениях биоптатов желудка и толстой кишки. Модели ИИ были обучены классифицировать изображения на аденокарциному, аденому и неопухолевые состояния, продемонстрирован высокий потенциал ИИ для использования в практике [28]. J. Park et al. представили алгоритм глубокого обучения для автоматической классификации эпителиальных опухолей желудка (аденомы и карциномы), основанный на CNN с использованием материала эндоскопических биоптатов [29]. Проведена проспективная оценка его эффективности в большой серии биопсий желудка и преимуществ в качестве вспомогательного инструмента для классификации изображений: 1 – отрицательный результат на дисплазию; 2 – тубулярная аденома; 3 – карцинома. Диагностическая эффективность алгоритма – 0,9790 для двухуровневой классификации (отрицательный и положительный результаты), при ограничении алгоритма эпителиальными опухолями чувствительность и специфичность составили 1,000 и 0,9749, соответственно. Алгоритм продемонстрировал высокую точность классификации эпителиальных опухолей, что подтверждает его преимущества в качестве вспомогательного инструмента, следовательно, он может служить потенциальной системой скрининга при исследовании биоптатов желудка. К.О. Cho et al. исследовали возможность создания полностью автоматизированной компьютерной диагностической системы на основе глубокого обучения с использованием целых изображений из набора данных аденокарциномы желудка [30]. По мнению этих авторов, необходимо создать многонациональный/многоцентровый набор данных для реального применения глубокого обучения в медицинской практике.

Н. Sharma et al. использованы методы глубокого обучения для автоматической классификации целых изображений карциномы желудка при окрашивании гематоксилином и эозином с помощью CNN. Модель применили для классификации РЖ на основе результатов иммуногистохимического исследования и наличия некроза, при этом общая точность составила 0,6990 для классификации рака и 0,8144 для обнаружения некроза [31]. Y. Hong et al. разработали модель ИИ на основе глубокого обучения для верификации соотношения опухоль–строма с использованием виртуального окрашивания на цитокератины в карциномах желудка, что может быть полезно при диагностике РЖ. Показатель глубокого обучения dTSR был значимо связан с общей выживаемостью пациентов ($P=0,0024$) [32].

РЖ характеризуется гистологическим и молекулярным разнообразием, что нередко препятствует быстрой и эффективной диагностике, во многом зависящей от опыта патолога и результатов трудоемких молекулярных анализов для выявления подтипа рака [33]. F. Su et al. разработали модель ИИ для распознавания степени дифференцировки РЖ и микросателлитной нестабильности (MSI) на основе использования

целых изображений при окрашивании гематоксилином и эозином. Модель достигала распознавания степени дифференцировки опухолей со значениями F1 0,8615 и 0,8977 для классов низко- и высокодифференцированной АК, статуса MSI с точностью 86,36% в когорте тестирования на окрашенных гематоксилином и эозином срезах [33].

Пациенты с АК желудка диффузного типа имеют более короткую продолжительность жизни и худший прогноз по сравнению с пациентами с АК кишечного типа, а раковые клетки АК диффузного типа нередко незаметны на фоне десмоплазии и воспаления. В связи с этим F. Kanavati и M. Tsuneki создали высокоэффективные модели ИИ на основе глубокого обучения для верификации АК желудка диффузного типа [34]. F. Kanavati et al. рекомендовали модели ИИ глубокого обучения с использованием трансферного обучения, обучения с учителем для прогнозирования перстневидно-клеточного РЖ на основе изображений 1765 целых срезов; лучшая модель достигла значения ROC AUC не менее 0,99 [35]. Q. Da et al. разработали модель ИИ на основе глубокого обучения с целью идентификации перстневидно-клеточного РЖ на целых изображениях для количественной оценки морфологических характеристик и атипичии опухолевых клеток, установили, что биологическое поведение опухоли можно предсказать путем количественного исследования морфологии раковых клеток с помощью ИИ на основе глубокого обучения, что может изменить подходы к лечению [36].

Выявление вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) у пациентов с РЖ имеет важное значение для принятия клинических решений и связано с конкретным ответом на лечение и прогнозом [37]. Y. Jeong et al. предложили метод прогнозирования присутствия ВЭБ с помощью ИИ на основе глубокого обучения с применением целых изображений препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных из Атласа генома рака и независимого учреждения. Разработанная авторами модель EBVNet состоит из двух последовательных компонентов: классификатора опухолей и классификатора ВЭБ. Ожидается, что модель EBVNet может быть полезна при предварительном скрининге, что, возможно, позволит снизить затраты, связанные с тестированием на ВЭБ [37]. Ассоциация РЖ с ВЭБ подтверждается дорогостоящим молекулярным тестом – гибридизацией *in situ* малых РНК, кодируемых ВЭБ. T.T.L. Vuong et al. разработали и проверили алгоритм ИИ глубокого обучения для прогнозирования статуса ВЭБ по изображениям биопсий ЖКТ, использовали участки изображения тканевого микрочипа и изображения целых срезов РЖ, продемонстрировали возможность прогнозирования статуса ВЭБ даже в образцах биопсии [38]. Использование такого классификатора на основе гистологических изображений перед подтверждающим молекулярным тестом позволит снизить затраты на диагностику карцином желудка, ассоциированных с ВЭБ. Опухоли с микросателлитной нестабильностью (MSI)/

дефицитом репарации несоответствия (dMMR) высокочувствительны к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек [39]. Для выявления этих подтипов необходимы дорогостоящие методы – иммуногистохимия и молекулярное тестирование, в связи с чем для скрининга этой подгруппы карцином M. Hinata и T. Ushiku разработали модель ИИ на основе глубокого обучения и целых изображений гистологических препаратов. Изображения использовались для обучения CNN с целью автоматического обнаружения подтипов ВЭБ и MSI/dMMR. Разработанная модель оказалась высокоэффективной. По-видимому, модели глубокого обучения на основе гистологических изображений могут использоваться для выявления подтипов ВЭБ и MSI/dMMR при РЖ в качестве экономически выгодной и менее трудоемкой альтернативы, которая может помочь эффективно стратифицировать пациентов, реагирующих на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек [37].

С целью определения стратегии лечения РЖ продолжаются исследования, связывающие конкретные генетические мутации и реакцию на терапию, для этого необходимы экономически эффективные методы анализа мутационного статуса [40]. H.J. Jang et al. разработали и успешно применили модели ИИ с использованием глубокого обучения для анализа изображений тканей, окрашенных гематоксилином и эозином, из набора данных GC Атласа генома рака (TCGA-STAD). Классификаторы дикого типа/мутаций для генов *CDH1*, *ERBB2*, *KRAS*, *PIK3CA* и *TP53* были обучены для прогнозирования мутаций при колоректальном раке, однако эти модели ИИ не смогли полностью предсказать мутационный статус при РЖ, что указывает на то, что классификаторы мутаций несовместимы при исследовании карцином различной локализации.

РЖ – высокогетерогенная опухоль, по-разному реагирующая на иммунотерапию. Идентификация иммунных подтипов РЖ может улучшить подходы к лечению, в связи с чем Y. Chen et al. создана модель ИИ с использованием методов глубокого обучения для верификации иммунных подтипов РЖ, оценки микроокружения опухоли, прогнозирования на основе целых изображений [41]. Эти специалисты использовали изображения РЖ из Атласа генома рака с обилием инфильтрирующих опухоль иммунных клеток, затем оценивали воспроизводимость кластеризации в независимой когорте из Gene Expression Omnibus. Создана модель ИИ для идентификации трех иммунных подтипов с различными иммунными клетками, инфильтрирующими опухоль, молекулярными особенностями и клиническими характеристиками. При подтипе 3 с лучшим прогнозом выявлено самое высокое содержание CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-активированных клеток, фолликулярных хелперных Т-клеток, макрофагов M1 и NK-клеток. Подтип 1 с наихудшим прогнозом характеризовался самой высокой инфильтрацией CD4+ Т-клетками, регуляторными Т-клетками, В-клетками и дендритными

клетками, а подтип 2 имел промежуточный прогноз. Данное исследование может быть полезным для понимания иммунного микроокружения опухоли при РЖ и, возможно, для выбора иммунотерапии.

Пациентам с наследственным диффузным РЖ с целью минимизации риска развития рака нередко проводят профилактическую гастрэктомию. При этом для выявления внутрислизистых дискогезивных карцином патологи исследуют операционный материал, что при наличии 150 или более препаратов на случай требует значительного времени [42]. Для решения данной проблемы S.A. Rasmussen et al. использовали методы ИИ для обнаружения карциномы. Исследованы образцы ткани, полученные при профилактической гастрэктомии, модель DenseNet-169 обучалась в течение 150 эпох на целых изображениях, при этом сеть обнаружила 100% опухолевых очагов и правильно исключила в среднем 99,9% негативных по раку областей, то есть продемонстрировала обнадеживающие результаты в области компьютерной диагностики наследственного диффузного РЖ.

Предиктивные и прогностические факторы, стадирование РЖ

С развитием и прогрессированием РЖ связаны различные биомаркеры, такие как белок HER2, трансмембранный тирозинкиназный рецептор EGFR. Указанные маркеры выявляют с помощью иммуногистохимии и молекулярных методов. В последние годы практическая молекулярная диагностика совершенствуется за счет использования ИИ и вспомогательных технологий. По мнению I. Pandey et al., применение машинного обучения и нейронных сетей глубокого обучения с расширенным анализом цифровых изображений стало новой отраслью цифровой патологии и внесло огромный вклад в прецизионную медицину и персональную диагностику [43].

TNM система и N-стадирование – решающий фактор для прогноза и определения тактики лечения рака. X. Wang et al. разработали модель ИИ глубокого обучения для анализа гистологических изображений целых срезов резецированных лимфатических узлов и идентификации участков опухоли с последующим определением соотношения площади опухоли и площади узла с метастазом (T/MLN). Эти специалисты продемонстрировали, что T/MLN является независимым прогностическим фактором, а модели глубокого обучения могут помочь не только патологам в обнаружении лимфатических узлов с метастазами, но и онкологам в изучении новых прогностических факторов [44].

Для обнаружения метастазов АК желудка в лимфатические узлы J. Matsushima et al. разработали эффективный диагностический алгоритм на основе модели ИИ глубокого обучения с использованием целых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином [45]. Метод может помочь патологам и снизить их рабочую нагрузку. При использовании алгоритма глубокого

обучения на основе ResNet-152 для обнаружения метастазов в лимфатических узлах на целых изображениях АК желудка J. Matsushima et al. установили, что чувствительность алгоритма при обнаружении метастазов в эталонном стандарте составила 0,869, при обнаружении микрометастазов – 0,785, эти относительно низкие показатели могут быть объяснены широким разнообразием гистотипов АК желудка [46].

На основе ретроспективного исследования с использованием препаратов РЖ кишечного и диффузного типов, окрашенных гематоксилином и эозином, и современной модели ИИ с применением глубокого обучения G.P. Veldhuizen et al. продемонстрировали возможность получения дополнительной клинически значимой информации, прогноза, оценки общей и безрецидивной выживаемости [47]. X. Ning et al. разработали модель с высоким уровнем точности и надежности (более 90%) на основе ИИ глубокого обучения для точной диагностики РЖ смешанного типа, прогнозирования риска метастазирования с использованием двух программ – U-Net и QuPath [48]. Нейронная сеть U-Net была обучена распознавать и сегментировать дифференцированные компоненты РЖ. Недифференцированные компоненты на одних и тех же изображениях были аннотированы с использованием QuPath. Результаты использованы для расчета соотношений дифференцированных/недифференцированных компонентов, которые коррелировали с наличием метастазов в лимфатических узлах. По мнению X. Ning et al., U-Net и QuPath демонстрируют многообещающую точность в идентификации дифференцированных и недифференцированных компонентов РЖ смешанного типа, а также в определении риска метастазирования. В. Huang et al. провели ретроспективное многоцентровое исследование с целью точной диагностики и прогнозирования общей выживаемости при РЖ с использованием глубокого обучения на основе цифровых изображений препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином [49]. Разработаны две эффективные модели ИИ: GastroMIL – для диагностики РЖ и MIL-GC – для прогнозирования исхода. Дискриминационная способность GastroMIL достигла точности 0,920, в прогностической модели C-индексы для оценки выживаемости достигали 0,657. Процесс прогнозирования доступен на сайте <https://baigao.github.io/Pathologic-Prognostic-Analysis/>.

M. Zhu et al. предложена модель глубокого обучения AIBISI на основе изображений с различными типами РЖ при окрашивании гематоксилином и эозином для прогнозирования и визуализации бактериальной инфекции, которая может влиять на предрасположенность к раку и прогрессирование опухоли, воздействуя на некоторые сигнальные пути метаболизма или иммунную систему [50]. Эффективность данной модели ИИ достигала 0,81 в зависимости от типа рака. D.H.W. Liu et al. установили, что количественная оценка инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (плотность TIL)

у пациентов с РЖ II–III стадии с применением методов ИИ на основе глубокого обучения может быть потенциальным прогностическим биомаркером эффекта адьювантной химиотерапии [51]. A. Meier et al. предложены новые способы прогнозирования при РЖ с помощью метода ИИ с использованием метода CNN на основе цифровых изображений тканевых микроматриц (ТМА), окрашенных иммуногистохимически. В дополнение к окрашиванию гематоксилином и эозином исследовано микроокружение опухоли с помощью маркеров CD8, CD20, CD68 и Ki67. Оценки риска, полученные с помощью CNN на основе глубокого обучения в сочетании с панелью иммуногистохимических маркеров, имели дополнительную прогностическую ценность по сравнению со стадией TNM [52]. T. Wei et al. предложена модель, основанная на глубоком обучении MultiDeepCox-SC, прогнозирующая общую выживаемость пациентов с РЖ путем интеграции гистологических изображений, клинических данных и оценки экспрессии генов. Прогностическая точность MultiDeepCox-SC (индекс С равен 0,744) превосходит соответствующий результат, основанный только на гистологическом изображении (индекс С равен 0,660). По мнению T. Wei et al., указанный полностью автоматизированный онлайн-прогностический инструмент, основанный на гистопатологических изображениях, клинических данных и экспрессии генов, может быть использован для повышения эффективности и точности работы патологоанатомов (<https://yu.life.sjtu.edu.cn/DeepCoxSC>) [53]. O.L. Saldanha et al. провели многоцентровое ретроспективное исследование для прогнозирования молекулярных биомаркеров – генетических aberrаций при РЖ с помощью технологии Swarm Learning. В работе использованы образцы тканей с известными микросателлитной нестабильностью (MSI) и статусом ВЭБ у четырех групп пациентов из Швейцарии, Германии, Великобритании и США [54]. Авторы продемонстрировали возможность прогнозирования молекулярных биомаркеров на основе Swarm Learning при РЖ. В будущем этот подход можно будет использовать для совместного обучения.

Неoadьювантная химиотерапия (НАС) является эффективным методом лечения местнораспространенного РЖ, однако для пациентов, которые не реагируют на НАС, лучшее время для операции может быть упущено, в связи с чем крайне важно отличать потенциальных респондентов от нереспондентов. Z. Zhou et al. использовали модели Inception-V3, Xception, EfficientNet-B5 и ансамбль CRSNet на основе глубокого изучения и гистологических изображений биоптатов, окрашенных гематоксилином и эозином, в качестве вспомогательного метода для прогнозирования ответа на НАС у пациентов с местнораспространенным РЖ, что позволяет индивидуализировать лечение при этом варианте опухоли [55]. CRSNet представляет собой новый инструмент для индивидуализированного лечения местнораспространенного РЖ.

Традиционные методы диагностики метастазов в лимфатические узлы трудоемки и отнимают много времени, в связи с чем Y. Hu et al. разработали и протестировали систему ИИ на основе глубокого обучения и целых изображений, способную выявлять метастазы в лимфатических узлах [56]. Эти специалисты объединили Faster RCNN и DeepLab в качестве каскадного алгоритма для обнаружения областей интереса, а модели Xception и DenseNet-121 объединили для идентификации метастатического рака.

Полученные результаты показали, что уровень дифференциации метастатического рака влияет на эффективность распознавания. Тем не менее указанные подходы, по-видимому, можно будет использовать для предварительного скрининга метастазов в лимфатических узлах у пациентов с РЖ.

Методы изучения гистологических изображений с помощью ИИ

Гистологическое исследование РЖ является золотым стандартом диагностики, однако компьютерные методы сложно оценить из-за нехватки общедоступных наборов изображений патологии желудка [57]. W. Hu et al. использовали общедоступную базу данных изображений небольших размеров при патологии GasHisSDB. Проведено обширное исследование с использованием традиционных методов машинного обучения и глубокого обучения: 1) традиционное машинное обучение достигало уровня точности 86,08% (минимум – всего 41,12%); 2) точность при глубоком обучении составила 96,47% (минимум – 86,21%); 3) показатели точности значительно различались в зависимости от классификаторов. По мнению W. Hu et al., первый общедоступный набор данных гистопатологии РЖ GasHisSDB может привлечь исследователей к изучению новых алгоритмов автоматизированной диагностики [57]. Автоматическая классификация изображений целого среза нередко является сложной задачей, требующей большого числа участков ткани с наличием злокачественных структур, имеется риск внесения шума вследствие присутствия доброкачественных областей, что обуславливает низкую точность классификации. С учетом этого M. Ashraf et al. предложили метод шумоподавления на основе глубокого обучения LossDiff для улучшения классификации изображений РЖ на целых срезах с использованием CNN [58]. Для уменьшения растущей нагрузки на патологов при исследовании биопсий желудка H. Abe et al. разработали систему на основе ИИ (AI-G). Авторы применили метод многоэтапной семантической сегментации патологии (MSP), использующий распределение значений признаков, извлеченных из участков цельных изображений. При проверке на уровне ткани MSP AI-G показал лучшую точность (91,0%), чем традиционный AI-G на основе патчей (PB AI-G) (89,8%) [59]. Известны методы на основе CNN для анализа гистологических изображений с целью обнаружения карцином, прогнозирования

ния риска, классификации подтипов рака. Многие из них используют фрагменты «небольшого окна», не содержащие достаточной информации для решения поставленных задач. В связи с этим S.C. Kosaraju et al. разработали многозадачную модель ИИ глубокого обучения Deep-Hipo. Эти специалисты провели оценку Deep-Hipo на разных типах целых изображений – высоко-, умеренно- и низкодифференцированной АК желудка, дискогезивной карциномы, нормальной слизистой желудка, при этом Deep-Hipo превзошла современные методы глубокого обучения [60]. Deep-Hipo является высокоэффективным современным методом глубокого обучения, она была применена к гистопатологическим изображениям Атласа генома рака (TCGA), АК желудка (TCGA-STAD) и АК толстой кишки TCGA (TCGA-COAD). Исходный код Deep-Hipo общедоступен по адресу <http://dataxlab.org/deep-hipo>.

Целые гистопатологические изображения крайне необходимы в диагностике РЖ, однако из-за их большой площади и различных размеров аномальной области выбор и анализ информативных участков в процессе автоматической диагностики представляют собой довольно сложную задачу. Для решения этой проблемы S. Wang et al. разработали перекалиброванный многоэкземплярный метод глубокого обучения (RMDL), продемонстрировавший значительное улучшение точности по сравнению с другими современными методами многоэкземплярного обучения [61]. Методы ИИ не заменяют врача-патолога, однако за счет применения ИИ можно достичь ряда преимуществ. Так, W. Va et al. продемонстрировали, что помощь ИИ повысила точность и эффективность диагностики РЖ [62]. C.L. Tung et al. показали, что ИИ с использованием глубокого обучения на основе изображений, окрашенных гематоксилином и эозином, может быть полезен при скрининге рака и контроле качества, предложили двухэтапный метод выявления рака в эндоскопических биоптатах желудка с использованием алгоритма YOLOv4 и 3D модели [63]. S. Vagui et al. проведено сравнение распознавания гистологических изображений двух моделей глубоких нейронных сетей DNN с помощью студентов Медицинской школы [64]. Установлено, что студенты при различении изображений вне рамок обучения лучше справляются с распознаванием сходства между тканями, то есть люди имеют преимущество в виде жизненного опыта, тогда как модели DNN обучаются только с использованием ограниченного набора изображений.

Заключение

В обзоре проанализированы современные данные о применении искусственного интеллекта для диагностики патологии желудка, полученные преимущественно с использованием морфологических методов исследования. Следует согласиться с утверждением M.A. Verbis et al., что в настоящее время доля научных публикаций, посвященных использованию искусствен-

ного интеллекта для оценки радиологических данных, значительно превышает количество статей, основанных на анализе результатов эндоскопии и морфологических исследований, при этом в работах чаще всего используется ретроспективный анализ данных и проводятся одноцентровые исследования. Большинство моделей искусственного интеллекта для изучения патологии желудка относится к категории научных исследований и имеет ограниченную ценность для практической патологоанатомической диагностики. В современных публикациях приводятся результаты, полученные при оценке гистологических изображений целых препаратов и фрагментов областей с патологическими изменениями, преимущественно используются модели искусственного интеллекта с применением методов глубокого обучения и ряда приемов для улучшения точности и специфичности исследований. Модели искусственного интеллекта посвящены изучению различных заболеваний и этапов морфогенеза карцином желудка – от выявления *Helicobacter pylori*, хронического гастрита, дисплазии, начальных стадий карцином желудка до метастазирования. Исследования направлены на верификацию различных гистотипов карцином, поиск биомаркеров для их выявления с помощью экономически эффективных методик, создание моделей искусственного интеллекта, выявляющих предиктивные и прогностические маркеры, что нацелено на персонализированное лечение пациентов с раком желудка. Можно ожидать, что методы радиомики и патомики, основанные на проспективных многоцентровых исследованиях с применением искусственного интеллекта на больших наборах данных, внесут неоспоримый вклад как в практическую гастроэнтерологию, так и в дальнейшее изучение разных этапов желудочного канцерогенеза.

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.). Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2022. 239 с. AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2022. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2022. 239 p. (In Russ.).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.

3. *Yousif M, Pantanowitz L.* Artificial intelligence-enabled gastric cancer interpretations: are we there yet? *Surg Pathol Clin.* 2023;16(4):673–86. DOI: 10.1016/j.path.2023.05.005.
4. *Berbis MA, Aneiros-Fernández J, Mendoza Olivares FJ, Nava E, Luna A.* Role of artificial intelligence in multidisciplinary imaging diagnosis of gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2021;27(27):4395–412. DOI: 10.3748/wjg.v27.i27.4395.
5. *Huang Z, Liu D, Chen X, Yu P, Wu J, Song B et al.* Retrospective imaging studies of gastric cancer: study protocol clinical trial (SPIRIT Compliant). *Medicine (Baltimore).* 2020;99(8):e19157. DOI: 10.1097/MD.00000000000019157.
6. *Wang Z, Liu Y, Niu X.* Application of artificial intelligence for improving early detection and prediction of therapeutic outcomes for gastric cancer in the era of precision oncology. *Semin Cancer Biol.* 2023;93:83–96. DOI: 10.1016/j.semcancer.2023.04.009.
7. *Niu PH, Zhao LL, Wu HL, Zhao DB, Chen YT.* Artificial intelligence in gastric cancer: application and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2020;26(36):5408–19. DOI: 10.3748/wjg.v26.i36.5408.
8. *Suganyadevi S, Seethalakshmi V, Balasamy K.* A review on deep learning in medical image analysis. *Int J Multimed Inf Retr.* 2022;11(1):19–38. DOI: 10.1007/s13735-021-00218-1.
9. *Tsuneki M, Kanavati F.* Weakly supervised learning for multi-organ adenocarcinoma classification in whole slide images. *PLoS One.* 2022;17(11):e0275378. DOI: 10.1371/journal.pone.0275378.
10. *Zhong H, Wang T, Hou M, Liu X, Tian Y, Cao S et al.* Deep learning radiomics nomogram based on enhanced CT to predict the response of metastatic lymph nodes to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2024;31(1):421–32. DOI: 10.1245/s10434-023-14424-0.
11. *Liu S, Deng J, Dong D, Fang M, Ye Z, Hu Y et al.* Deep learning-based radiomics model can predict extranodal soft tissue metastasis in gastric cancer. *Med Phys.* 2024;51(1):267–77. DOI: 10.1002/mp.16647.
12. *Jiang Y, Liang X, Wang W, Chen C, Yuan Q, Zhang X et al.* Noninvasive prediction of occult peritoneal metastasis in gastric cancer using deep learning. *JAMA Netw Open.* 2021;4(1):e2032269. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.32269.
13. *Yin M, Zhang R, Lin J, Zhu S, Liu L, Liu X et al.* Identification of gastric signet ring cell carcinoma based on endoscopic images using few-shot learning. *Dig Liver Dis.* 2023;55(12):1725–34. DOI: 10.1016/j.dld.2023.07.005.
14. *Ma M, Li Z, Yu T, Liu G, Ji R, Li G et al.* Application of deep learning in the real-time diagnosis of gastric lesion based on magnifying optical enhancement videos. *Front Oncol.* 2022;12:945904. DOI: 10.3389/fonc.2022.945904.
15. *Shi Z, Zhu C, Zhang Y, Wang Y, Hou W, Li X et al.* Deep learning for automatic diagnosis of gastric dysplasia using whole-slide histopathology images in endoscopic specimens. *Gastric Cancer.* 2022;25(4):751–60. DOI: 10.1007/s10120-022-01294-w.
16. *Luo J, Cao S, Ding N, Liao X, Peng L, Xu C.* A deep learning method to assist with chronic atrophic gastritis diagnosis using white light images. *Dig Liver Dis.* 2022;54(11):1513–19. DOI: 10.1016/j.dld.2022.04.025.
17. *Zheng W, Zhang X, Kim JJ, Zhu X, Ye G, Ye B et al.* High accuracy of convolutional neural network for evaluation of *Helicobacter pylori* infection based on endoscopic images: preliminary experience. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10(12):e00109. DOI: 10.14309/ctg.000000000000109.
18. *Klein S, Gildenblat J, Ihle MA, Merkelbach-Bruse S, Noh KW, Peifer M et al.* Deep learning for sensitive detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):417. DOI: 10.1186/s12876-020-01494-7.
19. *Gonçalves WGE, Santos MHPD, Brito LM, Palheta HGA, Lobato FMF, Demachki S et al.* DeepHP: a new gastric mucosa histopathology dataset for *Helicobacter pylori* infection diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14581. DOI: 10.3390/ijms232314581.
20. *Волкова Л.В., Шушвал М.С.* Морфологическая характеристика диспластических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухоли, при раке желудка кишечного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(3):47–54. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.47-54.
21. *Волкова Л.В., Шушвал М.С.* Морфологическая характеристика диспластических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухоли, при раке желудка кишечного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(3):47–54 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.47-54.
22. *Волкова Л.В., Шушвал М.С.* Морфологическая характеристика выявленных фоновых патологических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухолевому узлу, при раке желудка кишечного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(1):5–15. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15.
23. *Волкова Л.В., Шушвал М.С.* Морфологические особенности диспластических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухоли, при раке желудка кишечного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(1):5–15 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15.
24. *Iwaya M, Hayashi Y, Sakai Y, Yoshizawa A, Iwaya Y, Uehara T et al.* Artificial intelligence for evaluating the risk of gastric cancer: reliable detection and scoring of intestinal metaplasia with deep learning algorithms. *Gastrointest Endosc.* 2023;98(6):925–933e.1. DOI: 10.1016/j.gie.2023.06.056.
25. *Ma B, Guo Y, Hu W, Yuan F, Zhu Z, Yu Y et al.* Artificial intelligence-based multiclass classification of benign or malignant mucosal lesions of the stomach. *Front Pharmacol.* 2020;11:572372. DOI: 10.3389/fphar.2020.572372.
26. *Song Z, Zou S, Zhou W, Huang Y, Shao L, Yuan J et al.* Clinically applicable histopathological diagnosis system for gastric cancer detection using deep learning. *Nat Commun.* 2020;11(1):4294. DOI: 10.1038/s41467-020-18147-8.
27. *Zhang Y, Wang Y, Zhang B, Li Q.* A hyperspectral dataset of precancerous lesions in gastric cancer and benchmarks for pathological diagnosis. *J Biophotonics.* 2022;15(11):e202200163. DOI: 10.1002/jbio.202200163.
28. *Fu B, Zhang M, He J, Cao Y, Guo Y, Wang R.* StoHisNet: a hybrid multi-classification model with CNN and Transformer for gastric pathology images. *Comput Methods Programs Biomed.* 2022;221:106924. DOI: 10.1016/j.cmpb.2022.106924.
29. *Jang HJ, Song IH, Lee SH.* Deep learning for automatic subclassification of gastric carcinoma using whole-slide histopathology images. *Cancers (Basel).* 2021;13(15):381. DOI: 10.3390/cancers13153811.

28. Iizuka O, Kanavati F, Kato K, Rambeau M, Arihiro K, Tsuneki M. Deep learning models for histopathological classification of gastric and colonic epithelial tumours. *Sci Rep.* 2020;10(1):1504. DOI: 10.1038/s41598-020-58467-9.
29. Park J, Jang BG, Kim YW, Park H, Kim BH, Kim MJ et al. A prospective validation and observer performance study of a deep learning algorithm for pathologic diagnosis of gastric tumors in endoscopic biopsies. *Clin Cancer Res.* 2021;27(3):719–28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3159.
30. Cho KO, Lee SH, Jang HJ. Feasibility of fully automated classification of whole slide images based on deep learning. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2020;24(1):89–99. DOI: 10.4196/kjpp.2020.24.1.89.
31. Sharma H, Zerbe N, Klempert I, Hellwich O, Hufnagl P. Deep convolutional neural networks for automatic classification of gastric carcinoma using whole slide images in digital histopathology. *Comput Med Imaging Graph.* 2017;61:2–13. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2017.06.001.
32. Hong Y, Heo YJ, Kim B, Lee D, Ahn S, Ha SY et al. Deep learning-based virtual cytokeratin staining of gastric carcinomas to measure tumor-stroma ratio. *Sci Rep.* 2021;11(1):19255. DOI: 10.1038/s41598-021-98857-1.
33. Su F, Li J, Zhao X, Wang B, Hu Y, Sun Y et al. Interpretable tumor differentiation grade and microsatellite instability recognition in gastric cancer using deep learning. *Lab Invest.* 2022;102(6):641–9. DOI: 10.1038/s41374-022-00742-6.
34. Kanavati F, Tsuneki M. A deep learning model for gastric diffuse-type adenocarcinoma classification in whole slide images. *Sci Rep.* 2021;11(1):20486. DOI: 10.1038/s41598-021-99940-3.
35. Kanavati F, Ichihara S, Rambeau M, Iizuka O, Arihiro K, Tsuneki M. Deep learning models for gastric signet ring cell carcinoma classification in whole slide images. *Technol Cancer Res Treat.* 2021;20:15330338211027901. DOI: 10.1177/15330338211027901.
36. Da Q, Deng S, Li J, Yi H, Huang X, Yang X et al. Quantifying the cell morphology and predicting biological behavior of signet ring cell carcinoma using deep learning. *Sci Rep.* 2022;12(1):183. DOI: 10.1038/s41598-021-03984-4.
37. Jeong Y, Cho CE, Kim JE, Lee J, Kim N, Jung WY et al. Deep learning model to predict Epstein-Barr virus associated gastric cancer in histology. *Sci Rep.* 2022;12(1):18466. DOI: 10.1038/s41598-022-22731-x.
38. Vuong TTL, Song B, Kwak JT, Kim K. Prediction of Epstein-Barr virus status in gastric cancer biopsy specimens using a deep learning algorithm. *JAMA Netw Open.* 2022;5(10):e2236408. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.36408.
39. Hinata M, Ushiku T. Detecting immunotherapy-sensitive subtype in gastric cancer using histologic image-based deep learning. *Sci Rep.* 2021;11(1):22636. DOI: 10.1038/s41598-021-02168-4.
40. Jang HJ, Lee A, Kang J, Song IH, Lee SH. Prediction of genetic alterations from gastric cancer histopathology images using a fully automated deep learning approach. *World J Gastroenterol.* 2021;27(44):7687–704. DOI: 10.3748/wjg.v27.i44.7687.
41. Chen Y, Sun Z, Chen W, Liu C, Chai R, Ding J et al. The immune subtypes and landscape of gastric cancer and to predict based on the whole-slide images using deep learning. *Front Immunol.* 2021;12:685992. DOI: 10.3389/fimmu.2021.685992.
42. Rasmussen SA, Arnason T, Huang WY. Deep learning for computer-assisted diagnosis of hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol Transl Med.* 2021;55(2):118–24. DOI: 10.4132/jptm.2020.12.22.
43. Pandey I, Misra V, Pandey AT, Ramteke PW, Agrawal R. Artificial intelligence technologies empowering identification of novel diagnostic molecular markers in gastric cancer. *Indian J Pathol Microbiol.* 2021;64(Supplement):S63–8. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_950_20.
44. Wang X, Chen Y, Gao Y, Zhang H, Guan Z, Dong Z et al. Predicting gastric cancer outcome from resected lymph node histopathology images using deep learning. *Nat Commun.* 2021;12(1):1637. DOI: 10.1038/s41467-021-21674-7.
45. Matsushima J, Sato T, Ohnishi T, Yoshimura Y, Mizutani H, Koto S et al. The use of deep learning-based computer diagnostic algorithm for detection of lymph node metastases of gastric adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2023;31(6):975–81. DOI: 10.1177/10668969221113475.
46. Matsushima J, Sato T, Yoshimura Y, Mizutani H, Koto S, Matsusaka K et al. Clinical utility of artificial intelligence assistance in histopathologic review of lymph node metastasis for gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2023;28(8):1033–42. DOI: 10.1007/s10147-023-02356-4.
47. Veldhuizen GP, Röcken C, Behrens HM, Cifci D, Muti HS, Yoshikawa T et al. Deep learning-based subtyping of gastric cancer histology predicts clinical outcome: a multi-institutional retrospective study. *Gastric Cancer.* 2023;26(5):708–20. DOI: 10.1007/s10120-023-01398-x.
48. Ning X, Liu R, Wang N, Xiao X, Wu S, Wang Y et al. Development of a deep learning-based model to diagnose mixed-type gastric cancer accurately. *Int J Biochem Cell Biol.* 2023;162:106452. DOI: 10.1016/j.biocel.2023.106452.
49. Huang B, Tian S, Zhan N, Ma J, Huang Z, Zhang C et al. Accurate diagnosis and prognosis prediction of gastric cancer using deep learning on digital pathological images: a retrospective multi-centre study. *EBioMedicine.* 2021;73:103631. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103631.
50. Zhu M, Guo M, Liu CQ, Songyang Z, Dou WX, Xiong Y. Deep-learning model AIBISI predicts bacterial infection across cancer types based on pathological images. *Heliyon.* 2023;9(4):e15400. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e15400.
51. Liu DHW, Kim YW, Sefcovicova N, Laye JP, Hewitt LC, Irvine AF et al. Tumour infiltrating lymphocytes and survival after adjuvant chemotherapy in patients with gastric cancer: post-hoc analysis of the CLASSIC trial. *Br J Cancer.* 2023;128(12):2318–25. DOI: 10.1038/s41416-023-02257-3.
52. Meier A, Nekolla K, Hewitt LC, Earle S, Yoshikawa T, Oshima T et al. Hypothesis-free deep survival learning applied to the tumour microenvironment in gastric cancer. *J Pathol Clin Res.* 2020;6(4):273–82. DOI: 10.1002/cjp2.170.
53. Wei T, Yuan X, Gao R, Johnston L, Zhou J, Wang Y et al. Survival prediction of stomach cancer using expression data and deep learning models with histopathological images. *Cancer Sci.* 2023;114(2):690–701. DOI: 10.1111/cas.15592.
54. Saldanha OL, Muti HS, Grabsch HI, Langer R, Dislich B, Kohlruss M et al. Direct prediction of genetic aberrations from pathology images in gastric cancer with swarm learning. *Gastric Cancer.* 2023;26(2):264–74. DOI: 10.1007/s10120-022-01347-0.

55. Zhou Z, Ren Y, Zhang Z, Guan T, Wang Z, Chen W et al. Digital histopathological images of biopsy predict response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2023;26(5):734–42. DOI: 10.1007/s10120-023-01407-z.
56. Hu Y, Su F, Dong K, Wang X, Zhao X, Jiang Y et al. Deep learning system for lymph node quantification and metastatic cancer identification from whole-slide pathology images. *Gastric Cancer*. 2021;24(4):868–77. DOI: 10.1007/s10120-021-01158-9.
57. Hu W, Li C, Li X, Rahaman MM, Ma J, Zhang Y et al. GasHisSDB: a new gastric histopathology image dataset for computer aided diagnosis of gastric cancer. *Comput Biol Med*. 2022;142:105207. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2021.105207.
58. Ashraf M, Robles WRQ, Kim M, Ko YS, Yi MY. A loss-based patch label denoising method for improving whole-slide image analysis using a convolutional neural network. *Sci Rep*. 2022;12(1):1392. DOI: 10.1038/s41598-022-05001-8.
59. Abe H, Kurose Y, Takahama S, Kume A, Nishida S, Fukasawa M et al. Development and multi-institutional validation of an artificial intelligence-based diagnostic system for gastric biopsy. *Cancer Sci*. 2022;113(10):3608–17. DOI: 10.1111/cas.15514.
60. Kosaraju SC, Hao J, Koh HM, Kang M. Deep-Hipo: multi-scale receptive field deep learning for histopathological image analysis. *Methods*. 2020;179:3–13. DOI: 10.1016/j.ymeth.2020.05.012.
61. Wang S, Zhu Y, Yu L, Chen H, Lin H, Wan X et al. RMDL: recalibrated multi-instance deep learning for whole slide gastric image classification. *Med Image Anal*. 2019;58:101549. DOI: 10.1016/j.media.2019.101549.
62. Ba W, Wang S, Shang M, Zhang Z, Wu H, Yu C et al. Assessment of deep learning assistance for the pathological diagnosis of gastric cancer. *Mod Pathol*. 2022;35(9):1262–8. DOI:10.1038/s41379-022-01073-z.
63. Tung CL, Chang HC, Yang BZ, Hou KJ, Tsai HH, Tsai CY et al. Identifying pathological slices of gastric cancer via deep learning. *J Formos Med Assoc*. 2022;121(12):2457–64. DOI: 10.1016/j.jfma.2022.05.004.
64. Barui S, Sanyal P, Rajmohan KS, Malik A, Dudani S. Perception without preconception: comparison between the human and machine learner in recognition of tissues from histological sections. *Sci Rep*. 2022;12(1):16420. DOI: 10.1038/s41598-022-20012-1.

Информация об авторах

Лариса Владимировна Волкова – доктор медицинских наук, профессор кафедры медико-биологических дисциплин медицинского факультета Университета «Синергия».

Александр Витальевич Батищев – кандидат экономических наук, доцент, заведующий кафедрой искусственного интеллекта и анализа данных Университета «Синергия».

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.

Author information

Larisa V. Volkova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Department of Biomedical Disciplines, Faculty of Medicine, Moscow Financial and Industrial University “Synergy”.
<https://orcid.org/0000-0003-0938-8577>

Alexander V. Batishchev – Cand. Sci. (Econ.), Head of the Department of Artificial Intelligence and Data Analysis, Moscow Financial and Industrial University “Synergy”.
<https://orcid.org/0000-0003-4872-0608>

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”.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Особенности изменения гидродинамического сопротивления в сосудах микроциркуляторного русла легких при COVID-19 по результатам морфометрического исследования

В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский, Р.Е. Лахин, С.Г. Григорьев

ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. При общей заинтересованности в изучении характера поражения организма при коронавирусной инфекции (COVID-19) вопросы развития сердечного механизма смерти до конца не изучены. Летальность по сердечному типу требует поиска других путей развития сердечной недостаточности, одним из которых является повышение нагрузки на правый желудочек сердца из-за изменений сосудов пораженных легких. Цель работы заключалась в оценке изменения гидродинамического сопротивления в сосудах микроциркуляторного русла (МЦР) легких в соответствии с вариантом преобладающего в них патологического процесса и фазы COVID-19.

Материалы и методы. Проведен клинико-морфологический анализ 20 случаев летальных исходов у пациентов с основным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2». Морфометрически количественно оценивали внутренний диаметр артериол и венул, рассчитывали удельную площадь капилляров (УПК) и суммарный радиус капиллярного русла. По измерениям радиуса сосудов рассчитывали гидродинамическое сопротивление в отделах МЦР малого круга кровообращения.

Результаты. Фаза экссудации сопровождается увеличением просвета артериол и венул на фоне уменьшения удельной плотности капиллярного русла. В фазе ранней пролиферации происходит значительная редукция капиллярного ложа, также дилатация сменяется спастическими проявлениями в артериолах и в меньшей степени в венулах. Поздняя пролиферативная фаза характеризуется близкими по значению уровнями редукции суммарного радиуса капилляров и степенью вазоконстрикции артериол, особенно в зоне повышенной воздушности легочной ткани и разрастания соединительной ткани.

Заключение. Редукция капиллярного русла имеет первоочередное значение в повышении расчетного гидродинамического сопротивления в легочной ткани при COVID-19. Нарастание среднего расчетного гидродинамического сопротивления в легочной ткани в большей степени происходит в пролиферативных фазах (ранней и поздней) COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, легкие, сосуды

Для корреспонденции: Вадим Семенович Чирский. E-mail: v_chirsky@mail.ru

Для цитирования: Чирский В.С., Пламинский Д.Ю., Лахин Р.Е., Григорьев С.Г. Особенности изменения гидродинамического сопротивления в сосудах микроциркуляторного русла легких при COVID-19 по результатам морфометрического исследования. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):16–25. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.3.16-25.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 17.11.2023. Получена после рецензирования 29.01.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Features of hydrodynamic resistance in the vessels of microvasculature in the lungs during COVID-19 – morphometric study results

V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky, R.E. Lakhin, S.G. Grigoriev

S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Introduction. The nature of damage to the body in COVID-19 is of major interest; however, the cardiac mechanisms of death have not been fully studied. The causes of deaths from CVDs require a search for heart failure mechanisms, one of which is an increased burden on the right ventricle due to changes in the affected pulmonary blood vessels. The aim was to assess changes in hydrodynamic resistance in the pulmonary microvasculature in accordance with the variant of the prevailing pathological process in them and the COVID-19 phase.

Materials and methods. We performed clinical and morphological analyses of 20 lethal cases with the primary diagnosis of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2. We used morphometry to measure the internal

diameter of arterioles and venules, the specific capillary area (SCA), and the total radius of the capillary bed. The vascular radius formed the basis for calculating the hydrodynamic resistance in the sections of the microvasculature of the pulmonary circulation.

Results. The exudation phase is accompanied by an increased lumen of arterioles and venules against the background of a decreased specific density of the capillary bed. In the early proliferation phase, the capillary bed reduces significantly, and dilatation is replaced by spastic manifestations in arterioles and, to a lesser extent, in venules. The late proliferative phase has similar reduction levels in the total capillary radius and the degree of vasoconstriction of arterioles especially in the zone of increased airiness and grown connective tissue.

Conclusion. The reduced capillary bed is of primary importance in increasing the calculated hydrodynamic resistance in the lung tissue during COVID-19. The growth in the average calculated hydrodynamic resistance in the lung tissue occurs to a greater extent during the proliferative phases (early and late) of COVID-19 infection.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, lungs, vessels

Corresponding: Vadim S. Chirsky. E-mail: v_chirsky@mail.ru

For citation: Chirsky V.S., Plaminsky D.Yu., Lakhin R.E., Grigoriev S.G. Features of hydrodynamic resistance in the vessels of microvasculature in the lungs during COVID-19 – morphometric study results. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):16–25 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.16-25.

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

Received 17.11.2023. **Received in revised form** 29.01.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

По статистике на июнь 2023 года коронавирусной инфекцией (COVID-19) переболели более 690 млн человек, умерли 6,8 млн. Наиболее частой причиной летального исхода при COVID-19 являлась дыхательная недостаточность, однако, по данным разных источников, в 8–28% случаев основным механизмом смерти на фоне прогрессирования сердечной недостаточности становился кардиальный [1, 2]. Развитие данного механизма смерти у пациентов с COVID-19 во многом связывали с наличием признаков инфекционно-воспалительного и ишемического повреждения миокарда [3, 4]. При этом характер и степень их выраженности не могли в полной мере объяснить развитие катастрофы по кардиальному типу, что требовало поиска дополнительных факторов, оказывающих влияние на формирование сердечной недостаточности. Одним из таких факторов может являться повышение преднагрузки правого желудочка сердца за счет нарушения перфузии микрососудистого русла легких. Неоднородность движения крови по капиллярам, изменения сечения микроциркуляторного русла (МЦР) в пораженных легких ведут к увеличению в нем гидродинамического сопротивления [5–7]. Некоторые исследования показали, что уровень гидродинамического сопротивления во многом определяется характером и степенью изменения артериол, капилляров и венул, имеющих свои особенности в участках легкого с различными типами патологических процессов, меняющихся, в свою очередь, в зависимости от фазы COVID-19 [8–10].

Целью работы стала оценка изменения гидродинамического сопротивления в сосудах МЦР (артериол, капилляров и венул) легких в зависимости от варианта преобладающего в них патологического процесса и фазы COVID-19.

Материалы и методы

В рамках исследования проведен клинико-морфологический анализ 20 случаев летальных исходов у пациентов с основным диагнозом «коронавирусная инфекция COVID-19», вирус идентифицирован (U07.1), и шести случаев без патоморфологических признаков поражения легких из архива кафедры патологической анатомии ВМеДА им. С.М. Кирова (заключение независимого этического комитета при Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова от 21.11.2023 № 285). Инфицирование SARS-CoV-2 было прижизненно и посмертно подтверждено методом полимеразной цепной реакции. Исследование включало 21 мужчину и пять женщин в возрасте от 53 до 90 лет (средний возраст 71,5 года). Исследуемые случаи были сгруппированы по фазам проявления COVID-19 в три группы: 1-я фаза (с 1-го по 10-й день) – шесть пациентов (56–90 лет), 2-я фаза (с 11-го по 20-й день) – семь пациентов (55–88 лет), 3-я фаза (21 день и больше) – семь пациентов (66–83 года); в 4-ю группу (сравнения) вошли шесть пациентов, умерших скоропостижно без поражения легких. Сочетанной патологией у исследованных пациентов выступала артериальная гипертензия разной степени выраженности.

Для исследования брали фрагменты тканей из нижних отделов легкого. Гистологические препараты окрашивались по Вейгерту–ван Гизону для выявления эластических волокон и соединительной ткани и гематоксилином и эозином. Для каждой из зон (полнокровия, отека, ателектазов, повышенной воздушности легочной ткани, воспаления и разрастания фибробластической (грануляционной ткани) разной степени зрелости в просветах альвеол) исследовали по 10 артериол и венул, на основании измерений внутреннего диаметра сосудов (от 20 до 100 мкм) с помощью про-

граммного обеспечения CaseViewer 2.1 (3DNISTECH, Венгрия) рассчитывали их средний радиус $r = d/2$. Удельную плотность капилляров (УПК) рассчитывали в срезах легких с помощью морфометрической сетки В.С. Сидорина, при $\times 200$ в 10 полях зрения, УПК = количество капилляров в процентах (%) от 100. Суммарный радиус капиллярного русла получали из формулы $r = \sqrt{\text{УПК}/\pi}$. Для определения изменения гидродинамического сопротивления в сосудах с ламинарным течением крови в легком использовали формулу Пуазейля

$$Q = (P_1 - P_2)\pi r^2 / 8\eta L$$

в ее упрощенном виде:

$$R = 8\eta L / \pi r^4,$$

где Q – объемная скорость жидкости, $(P_1 - P_2)$ – разность давлений на концах сосуда, L – длина сосуда, η – вязкость крови, π – постоянная, отношение длины окружности к ее диаметру, r – радиус сосуда, R – величина гидродинамического сопротивления. Из нее следует, что если вязкость крови и длину сосудов условно считать постоянными величинами, то изменение гидродинамического сопротивления зависит от радиуса сосуда в соотношении $R \sim 1/r^4$, то есть при уменьшении радиуса сосуда в 2 раза (на 50%) гидродинамическое сопротивление в нем увеличивается в 16 раз (при увеличении в 2 раза – на 100%). Для вычисления сопротивления в сосудах относительно значений группы сравнения использовали отношение радиуса сосудов в процентах:

$$r\%_{\text{группы сравнения}} = (r_{\text{группы сравнения}} / r \times 100) - 100,$$

где r – радиус сосудов – переводили в сопротивление $R = (r\%_{\text{группы сравнения}} \times 16) / 50$, при уменьшении радиуса и $R = (r\%_{\text{группы сравнения}} \times 16) / 100$ при увеличении просвета относительно медианного значения группы сравнения [11–13].

Систематизацию исходной информации и корректировку полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Для статистической обработки и визуализации данных использовали программное обеспечение Statistica 10 (Tibco, США) для системы Windows. В качестве статистического метода использовался однофакторный дисперсионный анализ полученных значений. Для исследования выборки малого объема ($n=20$ и $n=6$) были применены непараметрические методики описательной статистики с определением медианы (Me), верхнего (Q1) и нижнего (Q3) квартилей. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика сосудов МЦР

Артериолы. В зоне полнокровия радиус артериол в 1-й фазе заболевания увеличен (в 1,3 раза) и примерно соответствовал этому показателю в группе сравнения во 2-й и 3-й фазах заболевания. В зоне отека радиус артериол в 1-й фазе заболевания увеличивался (в 1,4 раза), а во 2-й и 3-й фазах достоверные различия по сравнению с показателями группы сравнения не выявлены (табл. 1). В зоне ателектаза тенденция сохранялась: 1-я фаза заболевания характеризовалась увеличением радиуса артериол (в 1,3 раза), а во 2-й и 3-й фазах уменьшением в 1,1 раза по сравнению с радиусом артериол в группе сравнения. В зоне повышенной воздушности в 1-й фазе радиус артериол увеличивался (в 1,1 раза), во 2-й и 3-й фазах отмечалось уменьшение в 1,2 раза. В зоне воспаления в 1-й фазе радиус артериол увеличивался (в 1,1 раза) относительно группы сравнения, во 2-й и 3-й фазах он уже снижался до 1,1 раза. В зоне разрастания соединительной ткани радиус артериол во 2-й и 3-й фазах уменьшался в 1,1 раза.

Венулы. Радиус венул в зоне полнокровия характеризовался примерно одинаковым увеличением в разные фазы заболевания (в 1,1 раза) (табл. 1). Зона отека характеризовалась значимым увеличением просвета венул в 1-й фазе инфекции в 1,4 раза и во 2-й фазе в 1,1 раза, а в 3-й фазе заболевания отсутствием изменений. В зоне ателектаза в 1-й фазе заболевания увеличение радиуса венул составляло 1,1 раза, а во 2-й и 3-й фазах уменьшение в 1,1 раза. В зоне повышенной воздушности легочной ткани отмечалось уменьшение радиуса венул во 2-й и 3-й фазах в 1,1 раза. В зоне воспаления 1-я фаза заболевания характеризовалась увеличением просвета венул в 1,5 раза, а во 2-й и 3-й снижением в 1,1 раза. Для зоны разрастания соединительной ткани было характерно увеличение радиуса венул во 2-й фазе заболевания и уменьшение в 3-й фазе в 1,1 раза.

Капилляры. Суммарный радиус капилляров в легких в зонах полнокровия характеризовался снижением его показателей относительно значений группы сравнения во 2-й и 3-й фазах заболевания с 1,1 раза до 1,5 раза (табл. 2). В зоне отека отмечалась та же тенденция, уменьшение с 1,2 раза до 1,4. В зоне ателектаза в структуре показателей удельной площади капилляров легких установлено снижение в 1,1 раза в 1-й фазе, в 1,4 раза во 2-й и 3-й фазах относительно группы сравнения. В участках повышенной воздушности легочной ткани отмечено значимое уменьшение площади капиллярного русла – в 2,0, 2,1 – в 1-й и 3-й фазах и наименьший показатель – в 2,7 раза – установлен в 2-й фазе COVID-19. В 1-й фазе для зоны воспаления было характерно снижение удельной площади капилляров в легких в 1,4 раза, а во 2-й и 3-й фазах в 1,5 и 1,3 раза относительно этих показателей в группе сравнения. В зонах разрастания соединительной ткани во 2-й и 3-й фазе удельная площадь капилляров легких снизилась в 1,5 и 1,8 раза, соответственно, от значений группы сравнения.

Таблица 1 | Table 1

Радиус артериол и венул в зонах патологических изменений в фазы COVID-19 |
 Radia of arterioles and venules in the areas of pathological changes during COVID-19 phases

Фаза Phase	1-я фаза phase 1		2-я фаза phase 2		3-я фаза phase 3		Группа сравнения Comparison group	
Показатель Indicator	Радиус (r) артериол, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of arterioles, μm ² , n=6, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) венул, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of venules, μm ² , n=6, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) артериол, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of arterioles, μm ² , n=7, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) венул, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of venules, μm ² , n=7, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) артериол, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of arterioles, μm ² , n=7, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) венул, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of venules, μm ² , n=7, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) артериол, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of arterioles, μm ² , n=6, Me, (Q ₁₋₃)	Радиус (r) венул, мкм ² , Me (Q) Radius (r) of venules, μm ² , n=6, Me, (Q ₁₋₃)
Зона Zone								
без повреждения intact	23,7 (18,3; 28,8)	19,7 (18,1; 24,8)	23,7 (18,3; 28,8)	19,7 (18,1; 24,8)	23,7 (18,3; 28,8)	19,7 (18,1; 24,8)	23,7 (18,3; 28,8)	19,7 (18,1; 24,8)
полнокровия plethora	29,1 (28,1; 32,0) p=0,0002	25,5 (23,8; 28,8) p=0,02	25,6 (25,0; 29,0) p=0,03 **	23,3 (20,4; 24,9) p=0,6	26,7 (24,9; 27,6) p=0,04 **	22,2 (16,3; 22,2) p=0,3 **	–	–
отека edema	32,9 (29,3; 33,6) p=0,0001 **	29,5 (27,1; 32,5) p=0,0001 **	23,9 (19,1; 20,7) p=0,8 **	22,0 (20,4; 22,0) p=0,6 **	23,9 (22,1; 26,2) p=0,5 **	19,8 (16,3; 22,2) p=0,3 **	–	–
ателектазов atelectasis	31,0 (28,6; 33,6) p=0,0003 **	31,0 (28,3; 32,4) p=0,00003 **	21,5 (19,9; 25,3) p=0,7 **	20,5 (18,9; 21,9) p=0,7 **	22,4 (19,0; 24,0) p=0,6 **	19,6 (19,4; 20,0) p=0,3 **	–	–
повышенной воздушности increased airiness	25,0 (21,6; 28,8) p=0,3 **	23,8 (21,3; 27,1) p=0,8	19,8 (17,4; 21,6) p=0,03 **	21,6 (20,3; 22,9) p=0,9	18,3 (16,9; 22,1) p=0,002 **	19,8 (18,5; 21,4) p=0,3 **	–	–
воспаления inflammation	25,4 (23,8; 32,0) p=0,03 **	30,2 (27,7; 31,8) p=0,00008 **	21,7 (20,4; 23,6) p=0,5 **	18,3 (17,8; 19,7) p=0,08 **	21,9 (21,5; 24,2) *p=0,7 **	19,2 (17,4; 21,5) p=0,02 **	–	–
разрастания соединительной ткани connective tissue growth	–	–	21,3 (16,5; 24,8) p=0,3	23,8 (22,6; 24,2) p=0,1	20,3 (16,5; 23,0) p=0,2	19,1 (16,2; 20,4) p=0,07	–	–

p≤0,05 значений группы сравнения с группами 1-й, 2-й и 3-й фазы; ** p≤0,05 при сравнении значений группы 1-й фазы со 2-й и с 3-й

p≤0,05 when comparing the values of the comparison group with those of phases 1, 2, and 3; ** p≤0,05 when comparing the values of phase 1 with those of phases 2 and 3

Суммарный радиус капилляров | Total capillary radius

Фаза Phase	1-я фаза phase 1	2-я фаза phase 2	3-я фаза phase 3	Группа сравнения Comparison group
Показатель Indicator	Суммарный радиус капилляров, % Total radius of capillaries, %, n=6, Me (Q1–3)	Суммарный радиус капилляров, % Total radius of capillaries, %, n=7, Me (Q1–3)	Суммарный радиус капилляров, % Total radius of capillaries, %, n=7, Me (Q1–3)	Суммарный радиус капилляров, % Total radius of capillaries, %, n=6, Me (Q1–3)
Зона Zone				
без повреждения intact	2,4 (2,4; 2,7)	2,4 (2,4; 2,7)	2,4 (2,4; 2,7)	2,4 (2,4; 2,7)
полнокровия plethora	2,1 (1,9; 2,2) p=0,004	2,2 (1,6; 2,3) p=0,005 **	1,7 (1,6; 1,9) p=0,00008 **	–
отека edema	2,0 (1,6; 2,2) p=0,01	1,7 (1,3; 2,0) p=0,0003	1,8 (1,6; 2,0) p=0,0009	–
ателектазов atelectasis	2,2 (2,1; 2,4) p=0,58	1,7 (1,5; 1,9) *p=0,0001 **	1,7 (1,6; 2,0) p=0,0001 **	–
повышенной воздушности increased airiness	1,2 (1,1; 1,2) p=0,00002	1,0 (0,9; 1,1) p=0,00008	1,2 (1,1; 1,3) p=0,00006	–
воспаления inflammation	1,8 (1,5; 2,0) p=0,0001	1,7 (1,5; 1,8) p=0,00003	1,9 (1,5; 2,0) p=0,00009	–
разрастания соединительной ткани growth of connective tissue	–	1,6 (1,5; 1,8) p=0,00002	1,3 (1,1; 1,6) p=0,00006	–

p<0,05 при сравнении значений 1-й фазы со 2-й и с 3-й; ** p<0,05 при сравнении значений 2-й и 3-й фаз
p<0.05 when comparing the values of phase 1 with those of phases 2 and 3; ** p<0.05 when comparing the values of phases 2 and 3

Гидродинамическое сопротивление. Установив радиусы сосудов МЦР и приняв следствие формулы Пуазейля, удалось рассчитать степень изменения гидродинамического сопротивления в сосудах легких относительно группы сравнения (табл. 3).

Таким образом, сопротивление артериол в 1-й фазе заболевания в зоне полнокровия ниже значений группы сравнения в 3,6 раза (–5,2; –3,4), в зоне отека в 6, 7 раз (–7,2; –4,2), а в зоне ателектазов в 5,4 раза (–7,2; –3,7) (рис. 1 А). В зоне ателектазов и повышенной воздушности в ранней и поздней пролиферативных фазах гидродинамическое сопротивление увеличено относительно группы сравнения и экссудативной фазы в 2,3 раза (–1,4; –4,6), 1,1 раза (–1,1; 2,9), 4,7 раза (2,2; 8,0), 6,8 раза (1,5; 8,6), соответственно. В зоне воспаления и разрастания соединительной ткани в груп-

пах 2-й и 3-й фазы сопротивление выше по сравнению с показателями группы сравнения в 2,0 раза (–0,3; 3,9), 1,8 раза (–0,7; 2,3) и 2,7 раза (–1,1; 9,3), 4,0 раза (0,2; 9,2), соответственно (табл. 3).

В венах значение гидродинамического сопротивления в экссудативной фазе меньше по сравнению с таковым в группах 2-й и 3-й фаз COVID-19 и группы сравнения в зонах полнокровия в –3,6 раза (–6,2; –2,4), в зоне отека –6,7 (–9,0; –4,9) ателектазов –7,9 (–9,0; –5,8) и зоне воспаления в –7,3 (–8,5; –5,3) (рис. 1 В).

В капиллярном русле межальвеолярных перегородок легких отмечены наибольшие изменения, связанные с повышением гидродинамического сопротивления (табл. 3). Так, в зоне полнокровия повышение гидродинамического давления установлено в каждой из фаз COVID-19 в 4,6 раза (3,3; 7,1), 3,3 раза (2,3; 10,8)

Таблица 3 | Table 3

Степень изменения гидродинамического сопротивления капилляров в зонах патологических изменений в фазах COVID-19 |
Capillary hydrodynamic resistance changes in the areas of pathological findings during COVID-19 phases

Сосуды Vessels	Артериолы, × раз, Me (Q1–3) Arterioles, × times, Me (Q1–3)			Венулы, × раз, Me (Q1–3) Venules, × times, Me (Q1–3)			Капилляры, × раз, Me (Q1–3) Capillaries, × times, Me (Q1–3)		
	1-я фаза phase 1	2-я фаза phase 2	3-я фаза phase 3	1-я фаза phase 1	2-я фаза phase 2	3-я фаза phase 3	1-я фаза phase 1	2-я фаза phase 2	3-я фаза phase 3
Зона Zone									
полнокровия plethora	-3,6 (-5,2; -3,4) p=0,00002	-1,6 (-4,0; -1,2) p=0,00006	-2,4 (-0,4; 2,7) p=0,00006	-3,6 (-6,2; -2,4) p=0,00002	-2,0 (-3,1; -1,2) p=0,0001	-0,04 (-3,2; 3,2) p=0,0001	4,6 (3,3; 7,1) p=0,02	3,3 (2,3; 10,8) p=0,02	10,0 (7,7; 11,1) p=0,00001,
отека edema	-6,7 (-7,2; -4,2) p=0,00003 **	-0,5 (-2,9; 5,7) p=0,00003 **	-0,5 (-2,0; 1,4) p=0,00001 **	-6,7 (-9,0; -4,9) p=0,00003 **	-1,0 (-3,2; 0,5) p=0,00008 **	1,5 (-1,6; 6,8) p=0,00004 **	5,7 (2,8; 11,2) p=0,03	9,1 (5,5; 14,3) p=0,0005	8,8 (5,7; 10,8) p=0,001
ателектазов atelectasis	-5,4 (-7,2; -3,7) p=0,00002 **	2,3 (-1,4; -4,6) p=0,00003 **	1,1 (-1,1; 2,9) p=0,00002 **	-7,9 (-9,0; -5,8) p=0,00001 **	0,3 (-0,9; 2,9) p=0,00003 **	1,8 (1,2; 2,1) p=0,00006 **	3,5 (-0,0001; 4,7) p=0,1	9,8 (6,6; 11,7) p=0,0002	9,4 (5,7; 11,6) p=0,0002
повышенной воздушности increased airiness	-1,2 (-3,9; 2,3) p=0,0000001 **	4,7 (2,2; 8,0) p=0,0000001 **	6,8 (1,5; 8,6) p=0,00002 **	-2,4 (-4,9; -0,4) p=0,00003	-1,2 (-1,6; -0,3) p=0,00003	1,4 (-1,1; 3,3) p=0,00002	16,7 (16,5; 18,2) p=0,00005	18,6 (17,4; 20,5) p=0,00002	16,0 (15,5; 18,4) p=0,00002
воспаления inflammation	-1,5 (-6,1; 0,4) p=0,00001 **	2,0 (-0,3; 3,9) p=0,00003 **	1,8 (-0,7; 2,3) p=0,00002 **	-7,3 (-8,5; -5,3) p=0,00003 **	3,8 (1,6; 4,6) p=0,00006 **	2,3 (-1,2; 5,2) p=0,00002 **	8,8 (5,9; 12,0) p=0,0002	10,0 (7,8; 12,6) p=0,00005	7,1 (5,3; 12,1) p=0,0001
разрастания соединительной ткани growth of connective tissue	-	2,7 (-1,1; 9,3) p=0,00002	4,0 (0,2; 9,2) p=0,00003	-	-2,3 (-2,7; -1,4) p=0,00004	2,5 (0,6; 7,0) p=0,00003	-	10,4 (8,4; 12,3) p=0,00002	14,3 (11,3; 17,2) p=0,00002

* p≤0,05 при сравнении значений 1-й фазы со 2-й и с 3-й; ** p≤0,05 при сравнении значений 2-й и 3-й фаз

* p≤0,05 when comparing the values of phase 1 with those of phases 2 and 3; ** p≤0,05 when comparing the values of phases 2 and 3

и 10,0 раза (7,7; 11,1). В зоне отека повышение сопротивления происходило во всех фазах течения вирусной пневмонии – в 1-й в 5,7 раза (2,8; 11,2), во 2-й в 9,1 раза (5,5; 14,3), в 3-й в 8,8 (5,7; 10,8). В зоне ателектазов установлено повышение сопротивления в 1-й фазе, которое достигало 3,5 раза (–0,0001; 4,7), во 2-й фазе в 9,8 раза (6,6; 11,7), в 3-й фазе в 9,4 раза (5,7; 11,6) относительно показателей группы сравнения. В зоне повышенной воздушности легочной ткани рассчитаны следующие значения показателей гидродинамического сопротивления: в экссудативной фазе в 16,7 раза (16,5; 18,2), ранней и поздней пролиферативных фазах в 18,6 раза (17,4; 20,5) и 16,0 раза (15,5; 18,4), соответственно. Зона воспалительной инфильтрации имела отличия с таковой в группе сравнения, характе-

ризующиеся повышением сопротивления, в 1-й фазе в 8,8 раза (5,9; 12,0), во 2-й фазе в 10,0 раза (7,8; 12,6) и в 3-й фазе в 7,1 раза (5,3; 12,1). Зона разрастания соединительной ткани имела следующие значения гидродинамического сопротивления и различалась от показателей группы сравнения и во 2-й, и 3-й фазе. Так, в ранней пролиферативной фазе увеличение составляло 10,4 раза (8,4; 12,3), а в поздней – 14,3 раза (11,3; 21,3) (рис. 1 С).

Обсуждение

Согласно формуле Пуазейля, гидродинамическое сопротивление крови определяется ее вязкостью, длиной и величиной просвета сосудов. В своей работе мы исследовали только последний показатель, при этом

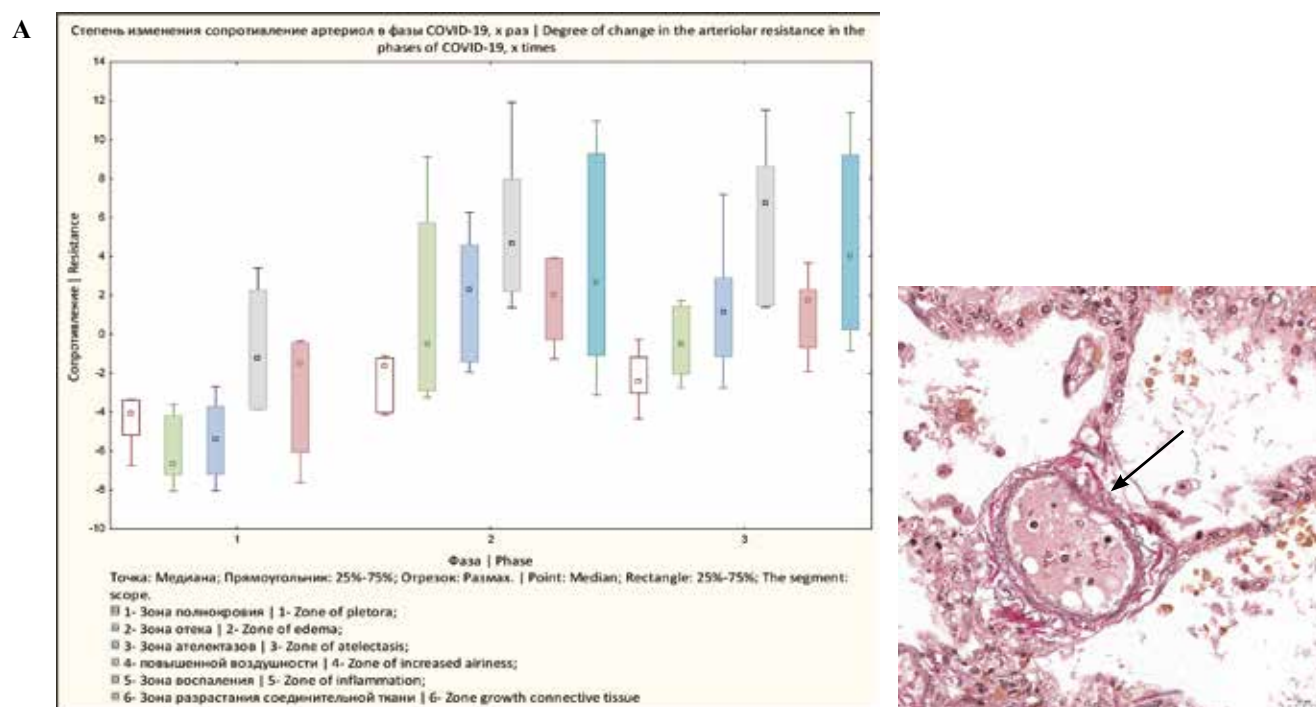


Рис. 1. Диаграммы изменения сопротивления сосудов микроциркуляторного русла относительно группы сравнения, Ме. Сосуды микроциркуляторного русла легкого.

А – степень изменения сопротивление артериол в фазы COVID-19, \times раз, артериола легкого в стадию экссудации, зона отека (стрелка), В – степень изменения сопротивление венул в фазы COVID-19, \times раз, венула легкого в стадию экссудации, зона полнокровия (стрелка), С – степень изменения сопротивление капилляров в фазы COVID-19, \times раз, капилляры легкого в стадию ранней пролиферации, зона разрастания незрелой соединительной ткани (стрелка). А–С – окраска по Вейгерту–Ван-Гизону, $\times 400$

Зоны: 1 – зона полнокровия, 2 – зона отека, 3 – зона ателектазов, 4 – зона повышенной воздушности, 5 – зона воспаления,

6 – зона разрастания незрелой соединительной ткани.

Фазы: экссудативная, ранняя пролиферативная, поздняя пролиферативная

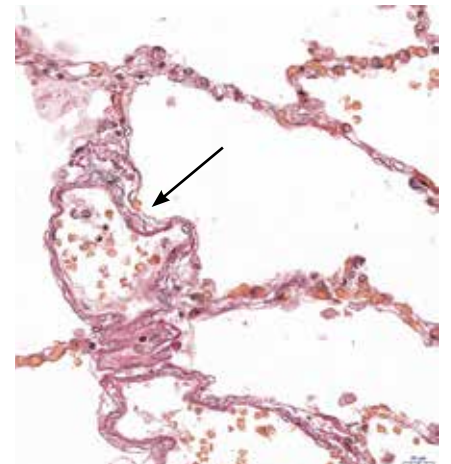
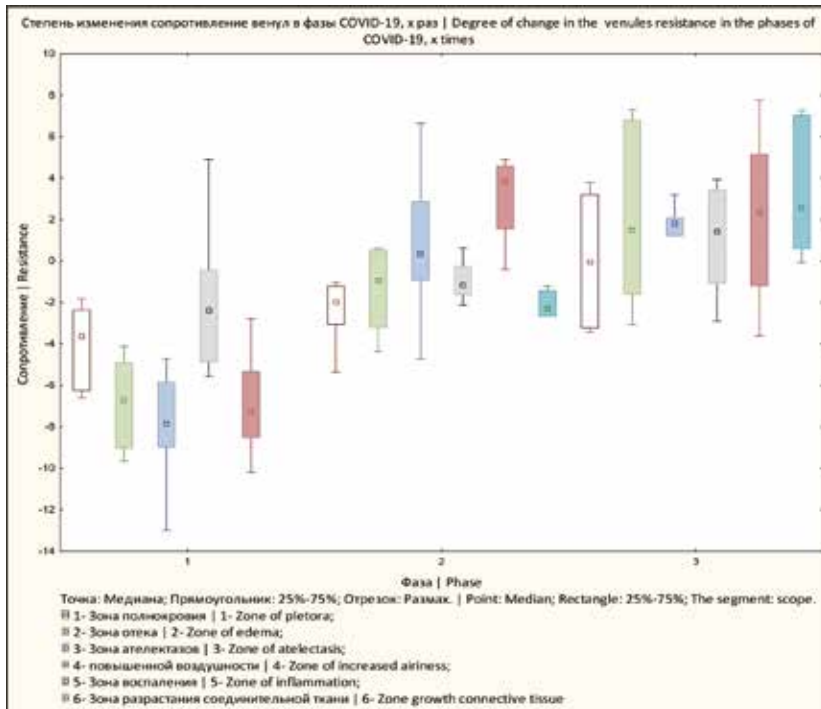
Fig. 1. Changes in vascular resistance of the microvasculature relative to the comparison group, Me. Vessels of the microvasculature of the lung.

А – the degree of changes in arteriolar resistance during COVID-19 phases, \times times, pulmonary arteriole in the exudation stage, zone of edema (arrow). В – the degree of changes in the resistance of venules in COVID-19 phases, \times times, pulmonary venule in the exudation stage, zone of plethora (arrow). С – the degree of changes in capillary resistance during COVID-19 phases, \times times, pulmonary capillaries in the early proliferative stage, a zone of immature connective tissue growth (arrow).

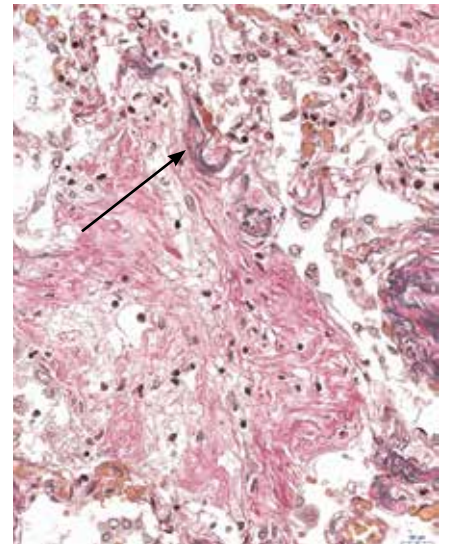
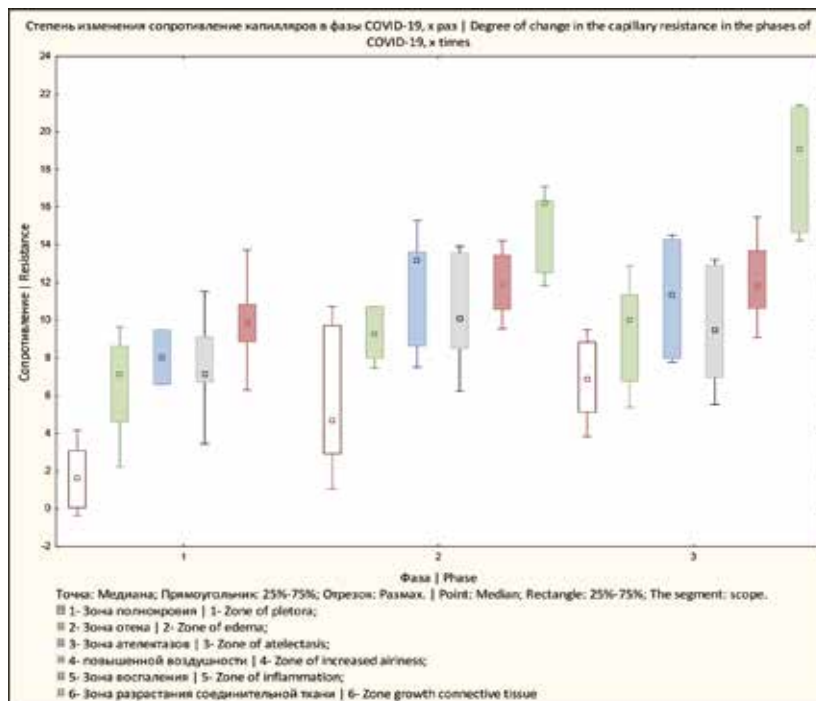
А–С – staining according to Weigert-Van Gieson, $\times 400$

Zones: 1 – plethora, 2 – edema, 3 – atelectasis, 4 – increased airiness, 5 – inflammation, 6 – immature connective tissue growth. Phases: exudative, early proliferative, late proliferative

В



С



анализировали его в артериолах, капиллярах и венулах легких. Перед нами стояли следующие вопросы: на сколько изменяется величина просвета сосудов при COVID-19 в ее разных фазах, при каких патологических процессах она происходит в большей степени и за счет каких сосудов преимущественно развивается повышение сопротивления?

В первой (экссудативной) фазе инфекционного процесса изменения сосудов МЦР в легких, по-видимому, происходят вследствие блокировки АПФ2 рецепторов вирусом SARS-CoV-2 [14].

Согласно данным, полученным нами, 1-я (экссудативная) фаза характеризовалась расширением артериол (в среднем в 1,2 раза, от 1,1 раза в зонах с повышенной воздушностью ткани легкого до 1,4 в зонах с отеком, ателектазами и полнокровием) с соответствующими значениями снижения гидродинамического сопротивления и венул в среднем в 1,3 раза (от 1,1 до 1,5 раза в зонах отека, ателектазов и воспаления) со значениями снижения гидродинамического сопротивления и уменьшением удельной площади капилляров (в среднем в 1,9 раза, в 1,5–4,4 раза в зонах отека, ателектазов, повы-

шенной воздушности легочной ткани и воспаления), то есть расчетное повышение гидродинамического сопротивления и нагрузки на правые отделы сердца могло произойти за счет редукции капиллярного русла. С учетом уровня УПК в разных патологических процессах и степени распространения этих процессов в легком величина гидродинамического сопротивления в 1-й фазе увеличивалась в 7,9 раза.

Во 2-й (ранней пролиферативной) фазе отмечались сужение артериол (в среднем в 1,1 раза, с соответствующими значениями в зонах повышенной воздушности и воспалением) и незначительное расширение венул, но наиболее значимым было уменьшение удельной площади капилляров (в среднем в 2,5 раза, в 2,2–5,7 раза в зонах разрастания соединительной ткани и повышенной воздушности), приводящее к расчетному повышению нагрузки на правые отделы сердца в 10,9 раза.

Полученные во 2-й фазе закономерности изменения размеров сосудов МЦП прослеживались и в 3-й (поздней пролиферативной) фазе COVID-19, где расчетное среднее повышение сопротивления на правые отделы сердца в 11,0 раза также происходило за счет редукции удельной площади капиллярного русла, уменьшавшейся в среднем в 2,6 раза (в 2,1–4,0 раза в зонах полнокровия, разрастания соединительной ткани и повышенной воздушности). Среднее уменьшение просвета артериол составляло 1,1 раза (1,2 раза в зонах повышенной воздушности легочной ткани).

Таким образом, оценивая роль разных сосудов в увеличении гидродинамического сопротивления крови, необходимо отметить, что при COVID-19 редукция сосудистого русла и, соответственно, увеличение гидродинамического сопротивления в большей степени происходят за счет капиллярного отдела МЦП в зонах повышенной воздушности (до 16,0–18,6 раза), несколько в меньшей степени за счет зон ателектазов, полнокровия, отека и воспаления (до 10 раз). Артериолы хотя и считаются резистивными сосудами, ответственными за создание $\frac{1}{2}$ сопротивления току крови [15], не играют при COVID-19 ведущей роли в создании гидродинамического сопротивления в легких.

Заключение

Редукция капиллярного русла имеет первоочередное значение в повышении расчетного гидродинамического сопротивления в легочной ткани при COVID-19. Нарастание среднего расчетного гидродинамического сопротивления в легочной ткани вследствие изменения сечения микроциркуляторного русла в большей степени происходит в пролиферативных фазах (ранней и поздней) COVID-19 (в 10,2 и 11,0 раза, соответственно), в экссудативной фазе оно составляет 7,9 раза. Наиболее значительно гидродинамическое сопротивление капиллярного русла возрастает в зоне повышенной воздушности легочной ткани (до 16,0–18,6 раза). В зонах полнокровия, отека, ателектазов и воспаления оно увеличивается примерно в 10 раз.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский.
Сбор и обработка материала – В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский, С.Г. Григорьев.
Написание текста – В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский.
Редактирование – В.С. Чирский, Д.Ю. Пламинский, Р.Е. Лахин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky.
Collected the data and performed the analysis – V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky, S.G. Grigoriev.
Wrote the paper – V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky.
Edited the manuscript – V.S. Chirsky, D.Yu. Plaminsky, R.E. Lakhin.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Mitrani RD, Dabas N, Goldberger JJ.* COVID-19 cardiac injury: implications for long-term surveillance and outcomes in survivors. *Heart Rhythm.* 2020;17(11):1984–90. DOI: 10.1016/j.hrthm.2020.06.026.
2. *Ермола Ю.А., Галышевская 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.
3. *Babapoor-Farrokhran S, Gill D, Walker J, Rasekhi RT, Bozorgnia B, Amanullah A.* Myocardial injury and COVID-19: possible mechanisms. *Life Sci.* 2020;253:117723. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117723.
4. *Мирзоев Н.Т., Кутелев Г.Г., Пугачев М.И., Куреева Е.Б.* Сердечно-сосудистые осложнения у пациентов, перенесших COVID-19. Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2022;24(1):199–208. DOI: 10.17816/brmma90733.
Mirzoev NT, Kutelev GG, Pugachev MI, Kireeva EB. Cardiovascular complications in patients after after coronavirus disease-2019. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2022;24(1):199–208 (In Russ.). DOI: 10.17816/brmma90733.
5. *Bleakley C, Singh S, Garfield B, Morosin M, Surkova E, Mandalia MS et al.* Right ventricular dysfunction in critically ill COVID-19 ARDS. *Int J Cardiol.* 2021;327:251–8. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.11.043.
6. *D'Alto M, Marra AM, Severino S, Salzano A, Romeo E, De Rosa R et al.* Right ventricular-arterial uncoupling independently predicts survival in COVID-19 ARDS. *Crit Care.* 2020;24(1):670. DOI: 10.1186/s13054-020-03385-5.
7. *Lan Y, Liu W, Zhou Y.* Right ventricular damage in COVID-19: association between myocardial injury and COVID-19. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:606318. DOI: 10.3389/fcvm.2021.606318.

8. Самсонова М.В., Черняев А.Л., Омарова Ж.Р., Першина Е.А., Мишнев О.Д., Зайратьянц О.В. и др. Особенности патологической анатомии легких при COVID-19. Пульмонология. 2020;30(5):519–532. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532.
Samsonova MV, Chernyaev AL, Omarova ZhR, Pershina EA, Mishnev OD, Zayratyants OV et al. Features of pathological anatomy of lungs at COVID-19. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology Journal.* 2020;30(5):519–532 (In Russ.). DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-5-519-532.
9. 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.
10. Крюков Е.В., Шуленин К.С., Черкашин Д.В., Чирский В.С., Тимофеев И.В., Железняк И.С. и др. Патогенез и клинические проявления поражения сердечно-сосудистой системы у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19): Учебное пособие. Санкт-Петербург: Веда Принт, 2021. 36 с. Доступно по адресу: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_46333748_85073373.pdf (получено 23.10.2023).
Kryukov EV, Shulenin KS, Cherkashin DV, Chirskii VS, Timofeev IV, Zheleznyak IS. Pathogenesis and clinical manifestations of cardiovascular lesions in patients with novel coronavirus infection (COVID-19): Study Guide. Saint Petersburg: Veda Print, 2021. 36 p. (In Russ.). Available from: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_46333748_85073373.pdf (accessed 23.10.2023).
11. Widrich J, Shetty M. Physiology, pulmonary vascular resistance. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024. PMID: 32119267.
12. Hirshfeld JW Jr, Nathan AS. Deriving function from structure: applying Hagen-Poiseuille to coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv.* 2020;13(4):498–501. DOI: 10.1016/j.jcin.2019.11.031.
13. Hoiland RL, Ainslie PN. CrossTalk proposal: the middle cerebral artery diameter does change during alterations in arterial blood gases and blood pressure. *J Physiol.* 2016;594(15):4073–5. DOI: 10.1113/JP271981.
14. Петриков С.С., Иванников А.А., Васильченко М.К., Эсауленко А.Н., Алиджанова Х.Г. COVID-19 и сердечно-сосудистая система. Часть 1. Патофизиология, патоморфология, осложнения, долгосрочный прогноз. Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2021;10(1):14–26. DOI: 10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26.
Petrikov SS, Ivannikov AA, Vasilchenko MK, Esaulenko AN, Alidzhanova KhG. COVID-19 and cardiovascular system: pathophysiology, pathomorphology, complications, long-term prognosis. *Russian Sklifosovsky Journal of “Emergency Medical Care”.* 2021;10(1):14–26. DOI: 10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26.
15. Евлахов В.И., Поясов И.З., Овсянников В.И. Механизмы взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2020;106(2):189–204. DOI: 10.31857/S0869813920020041.
Evlakhov VI, Poyassov IZ, Ovsyannikov VI. The mechanisms of cardiopulmonary interaction. *Russian Journal of Physiology.* 2020;106(2):189–204 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0869813920020041.

Информация об авторах

Вадим Семенович Чирский – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Дмитрий Юрьевич Пламинский – преподаватель кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Роман Евгеньевич Лахин – доктор медицинских наук, профессор кафедры военной анестезиологии и реаниматологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Степан Григорьевич Григорьев – доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Author information

Vadim S. Chirsky – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Anatomic Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0003-3215-3901>

Dmitry Yu. Plaminsky – Lecturer, Department of Anatomic Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0002-6422-5001>

Roman E. Lakhin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Military Anesthesiology and Reanimatology, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0001-6819-9691>

Stepan G. Grigoriev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Senior Researcher, Research Center, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0003-1095-1216>

Нейтрофильные синцитии в периферической крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19)

Л.М. Сомова¹, С.А. Абрамова¹, Е.И. Дробот¹, Е.В. Пустовалов^{1,2}, И.Н. Ляпун¹, М.Ю. Щелканов^{1,2,3}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

² ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³ ФГБУН Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

Резюме. Введение. COVID-19, этиологически связанная с коронавирусом SARS-CoV-2 инфекционная болезнь, проявляется лихорадкой, респираторными симптомами, а также лимфоцитопенией. Механизмы патогенеза COVID-19 остаются в значительной степени неясными. Установлено, что инфицирование вирусом SARS-CoV-2 может приводить к образованию многоядерных синцитиев, которые преобладают в тканях легких и могут нацеливаться на лимфоциты, потенциально способствуя лимфоцитопении. Образование этих структур расценивается как результат фузогенной способности шиповидного (спайкового) белка SARS-CoV-2. Целью настоящей работы было исследование морфологии и патогенетического значения межклеточных взаимодействий лейкоцитов периферической крови у пациентов с коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Исследована кровь 30 пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, находившихся на лечении в 2021–2022 годах в краевой клинической больнице № 2 Владивостока. Диагноз «коронавирусная инфекция» (COVID-19) был подтвержден с помощью ПЦР-теста. Фиксированные в OsO₄ образцы лейкоконцентра та периферической крови были залиты в эпоксидную смолу White Resin с последующим приготовлением ультратонких срезов.

Результаты. Настоящее исследование показало, что на фоне морфологической аномалии лейкоцитов, выявленной нами ранее, в периферической крови пациентов с COVID-19 формируются нейтрофильные синцитии, состоящие из клеток, соединенных между собой цитоплазматическими мостиками. Прослежены три этапа формирования нейтрофильного синцития: на первом этапе наблюдается сближение клеток друг с другом с образованием крупных выростов, участвующих в процессе стыковки клеток; на втором этапе выявлено образование синаптической связи между клетками (щелевой контакт); на третьем этапе происходило полное слияние наружных мембран клеток с образованием синцития.

Заключение. Анализ полученных результатов позволяет высказать предположение, что выявленное нами формирование нейтрофильных синцитиев в периферической крови пациентов с COVID-19 создает условия для гематогенной диссеминации SARS-CoV-2 и вирусемии с генерализацией инфекции и развитием полиорганной патологии.

Ключевые слова: кровь, лейкоциты, нейтрофильные синцитии, морфология, COVID-19, коронавирус, SARS-CoV-2

Для корреспонденции: Лариса Михайловна Сомова. E-mail: l_somova@mail.ru

Для цитирования: Сомова Л.М., Абрамова С.А., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В., Ляпун И.Н. Щелканов М.Ю. Нейтрофильные синцитии в периферической крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19). Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):26–33. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.26-33.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 141-00089-21-02) при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60212 «Комплексный эколого-вирусологический мониторинг коронавирусов в экосистемах Дальнего Востока».

Статья поступила 14.03.2024. Получена после рецензирования 25.03.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients with coronavirus infection (COVID-19)

L.M. Somova¹, S.A. Abramova¹, E.I. Drobot¹, E.V. Pustovalov^{1,2}, I.N. Lyapun¹, M.Yu. Shchelkanov^{1,2,3}

¹ Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

³ A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Vladivostok, Russia

Abstract. Introduction. COVID-19, an infectious disease etiologically related to the coronavirus SARS-CoV-2, manifests with fever, respiratory symptoms, and lymphocytopenia. Pathogenic mechanisms of COVID-19

remain largely unclear. SARS-CoV-2 infection was found to cause the formation of multinucleated syncytia, which dominate in lung tissues and can target lymphocytes, potentially contributing to lymphocytopenia. The formation of these structures is considered to be the result of the fusogenic ability of the SARS-CoV-2 spike-like protein. The aim was to study the morphology and pathogenic significance of intercellular interactions of peripheral blood leukocytes in patients with coronavirus infection caused by SARS-CoV-2.

Materials and methods. We studied blood samples of 30 patients infected with the SARS-CoV-2 virus, who underwent treatment in the Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, in 2021–2022. The COVID-19 diagnosis was confirmed using a PCR test. Peripheral blood buffy coat samples fixed in OsO₄ were embedded in white resin epoxy (Sigma-Aldrich, USA), and then ultrathin sections were prepared.

Results. Against the background of the morphological leukocyte abnormality, in the peripheral blood of patients with COVID-19, neutrophilic syncytia were formed. These syncytia consisted of cells interconnected by cytoplasmic bridges. We distinguished three stages of the neutrophilic syncytium formation, at the first one, cells approaching each other and forming large outgrowths involved in cell docking. The second one was characterized by the formation of a synaptic connection between cells (split contact). At the last stage, outer cell membranes fused completely and the syncytium formed.

Conclusion. Based on our analysis we assume that the formation of neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients with COVID-19 creates conditions for hematogenous dissemination of SARS-CoV-2 and viremia, generalization of infection and the development of multiorgan pathology.

Keywords: blood, leukocytes, neutrophil syncytia, morphology, COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2

Corresponding author: Larisa M. Somova. E-mail: l_somova@mail.ru

For citation: Somova L.M., Abramova S.A., Drobot E.I., Pustovalov E.V., Lyapun I.N., Shchelkanov M. Yu. Neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients with coronavirus infection (COVID-19). Clin. exp. morphology. 2024;13(3):26–33 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.26-33.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (No. 141-00089-21-02) and was supported by the RFBR Project No. 20-04-60212 “Integrated ecological and virological monitoring of coronaviruses in the ecosystems of the Far East”.

Received 14.03.2024. **Received in revised form** 25.03.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Пандемия коронавирусного заболевания 2019 года (COVID-19 – Coronavirus disease 2019), связанного с коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома коронавируса 2-го типа (SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory virus 2) (Nidovirales: Coronaviridae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus) [1–3], создала беспрецедентные угрозы для общественного здравоохранения во всем мире. Это заболевание клинически преимущественно проявляется лихорадкой (>88%), респираторными симптомами (>67%), а также лимфоцитопенией (83%) [4]. До настоящего времени молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе патогенеза COVID-19, остаются в значительной степени неясными.

Исследование Z. Zhang et al. [5] раскрыло ранее неизвестный механизм, лежащий в основе патогенеза инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и предоставило потенциально новые мишени для терапии COVID-19. Эти авторы обнаружили, что инфицирование вирусом SARS-CoV-2 приводило к образованию многоядерных синцитиев, которые преобладают в тканях легких и могут нацеливаться на лимфоциты для интернализации и межклеточной элиминации, потенциально способствуя лимфоцитопении и патогенезу заболевания у пациентов с COVID-19. Установлено [5, 6], что эти уникальные клеточные структуры являются прямым результатом инфицирования вирусом SARS-CoV-2, связанным с экспрессией спайкового S-белка, быстро

вызывающего слияние клеточных мембран в легких пациентов с COVID-19, которое авторы расценивают как следствие фузогенной (от англ. fusion – слияние) способности спайкового белка, его субъединицы S2. Инфицирование вирусом SARS-CoV-2 приводит к экспрессии фузогенного белка S на мембране клеток хозяина, способствуя слиянию инфицированных клеток с другими (как инфицированными, так и неинфицированными) клетками с формированием синцитиев [6–8].

Цель настоящей работы – исследовать морфологию и патогенетическое значение межклеточных взаимодействий лейкоцитов периферической крови у пациентов с коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Для изучения морфологии циркулирующих лейкоцитов была взята кровь от 30 пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, находившихся в 2021–2022 годах на лечении в краевой клинической больнице № 2 Владивостока. Диагноз «коронавирусная инфекция» (COVID-19) был подтвержден с помощью ПЦР-теста. Из 30 пациентов женщины составили 18, мужчины 12; возраст пациентов варьировал от 24 до 89 лет: до 30 лет – два человека, от 31 до 50 лет – три, от 51 до 80 лет – 22, старше 80 лет – три. Средний возраст – 61 год. При поступлении в стационар получено информированное добровольное согласие пациентов на медицинское вмешательство (приложение № 2 к приказу Минздрава России от 12.11.2021

№ 1051н). На проведение морфологического исследования крови пациентов с COVID-19 получено разрешение локального этического комитета НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.11.2021) [9].

Проведено морфологическое исследование лейкоконцентрата периферической крови пациентов с COVID-19 с помощью электронной микроскопии, как указано нами ранее [10]: для получения лейкоконцентрата в мерную центрифужную пробирку с антикоагулянтом (гепарин в количестве 5 Ед на 1 мл крови) брали 10 мл крови из локтевой вены, осторожно смешивали и помещали в термостат под углом 45° при температуре +37° на 20–30 минут. Верхний слой плазмы осторожно отсасывали пастеровской пипеткой и удаляли. Нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку отбирали в чистую центрифужную пробирку, центрифугировали в течение 7–10 минут со скоростью 800–1000 об./мин, при которой не происходит разрушение клеток. После центрифугирования надосадочную жидкость отсасывали из пробирки и получали осадок лейкоконцентрата для электронномикроскопического исследования.

Полученные образцы лейкоконцентрата фиксировали при комнатной температуре в течение 1 часа фиксатором Ито, содержащим растворы параформальдегида и пикриновой кислоты, на 0,15 М фосфатном буфере pH 7,3. Образцы трехкратно отмывали от фиксатора Ито 0,15 М фосфатным буфером pH 7,3 путем центрифугирования по 15 минут каждый цикл, дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия (OsO_4) в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем трехкратно отмывали от осмиевого фиксатора 0,15 М фосфатным буфером pH 7,3, центрифугирование по 15 минут каждый цикл.

Далее образцы лейкоконцентрата обезвоживали в 50° и 70° этаноле и заливали в эпоксидную смолу White resin, согласно инструкции производителя, в полихлорвиниловых капсулы. Для полимеризации смолы использовали два температурных режима: +37°C (в течение 1 суток), +60°C (в течение 2 суток). Для обработки материала применяли реактивы и эпоксидную смолу фирмы Sigma-Aldrich (США).

На ультрамикротоме LKB Bromma 2088 Ultrame V (Швеция) готовили ультратонкие срезы толщиной около 80 нм, контрастировали их насыщенным раствором уранилацетата и дополнительно щелочным раствором 0,02% цитрата свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофотосъемку проводили на фотопластинки размером 6×9 см для промышленных и научных целей ПФП-01Т (АО «Компания «Славич»», Россия).

Результаты

На электронномикроскопических снимках лейкоцитов периферической крови пациентов с COVID-19 помимо карипатологических изменений этих клеток, описанных нами ранее [10], обращало на себя внимание

наличие нейтрофильных синцитиев, представляющих собой структуры, состоящие из клеток, соединенных между собой цитоплазматическими мостиками (рис. 1).

При анализе ультраструктурных данных прослежены три этапа формирования нейтрофильного синцития. На первом этапе наблюдалось сближение клеток друг с другом, при этом на поверхности многих нейтрофилов обнаруживались единичные покрытые плазмалеммой крупные выросты цитоплазмы крючковидной формы, отличающиеся от микроворсинок и участвующие в процессе стыковки клеток (рис. 2). На втором этапе

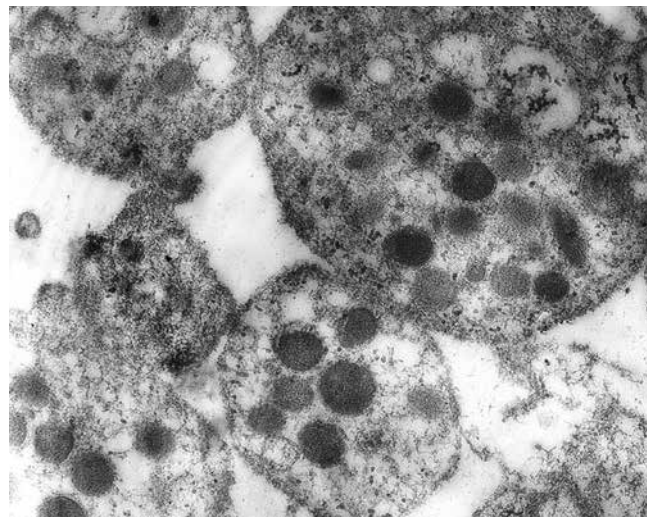


Рис. 1. Структура, состоящая из лейкоцитов, соединенных между собой цитоплазматическими перемычками, в крови пациента с COVID-19. ТЭМ, ×10 000

Fig. 1. A structure consisting of leukocytes connected by cytoplasmic bridges in the blood of a patient with COVID-19. TEM, ×10 000

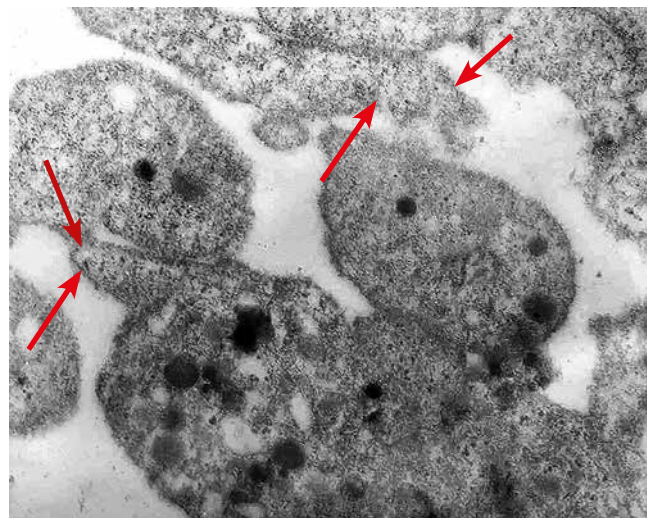


Рис. 2. Крупные выросты цитоплазмы крючковидной формы (стрелки), участвующие в процессе стыковки лейкоцитов, в крови пациента с COVID-19. ТЭМ, ×10 000

Fig. 2. Large hook-shaped outgrowths of cytoplasm (arrows) involved in leukocyte docking in the blood of a patient with COVID-19. TEM, ×10 000

выявлялось образование синаптической связи с появлением между сблизившимися клетками вуалевидной субстанции низкой электронной плотности (рис. 3). На третьем этапе наблюдалось полное слияние наружных мембран клеток с образованием нейтрофильного синцития (рис. 4, 5). Увеличение площади синцития происходило за счет присоединения близлежащих клеток. В некоторых клетках синцития нам удалось обнаружить вирусоподобные частицы (рис. 6).

Обсуждение

По данным Н. Huang et al. [11], формирование синцитиев отождествляется с cell-in-cell (CIC) феноменом. Показано, что при COVID-19 этот феномен может способствовать лимфоцитопении за счет интернализации

и уничтожения иммунных клеток, что делает феномен «клетка в клетке» новым игроком в более широком спектре патологических процессов, таких как иммунная дисрегуляция [12].

Cell-in-cell явление, характеризующееся активным проникновением одной или нескольких жизнеспособных клеток в другую клетку, обнаружено более века назад, но только в последние годы привлекло большое внимание исследователей и становится актуальной темой благодаря своему биологическому значению в эволюции, а также физиологическому и патологическому значению в развитии организма, гомеостазе и при различных заболеваниях [12]. Это явление долгое время игнорировалось – до тех пор, когда появились сообщения о новом пути гибели клеток, опосредованном

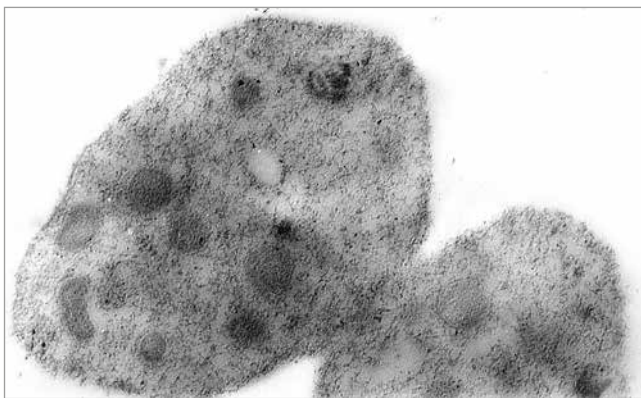


Рис. 3. Синаптическая связь в виде вуалевидной субстанции низкой электронной плотности между двумя сблизившимися лейкоцитами крови пациента с COVID-19. ТЭМ, $\times 20\ 000$

Fig. 3. Synaptic connection in the form of a veil-like substance of low electron density between two adjacent blood leukocytes of a patient with COVID-19. TEM, $\times 20\ 000$

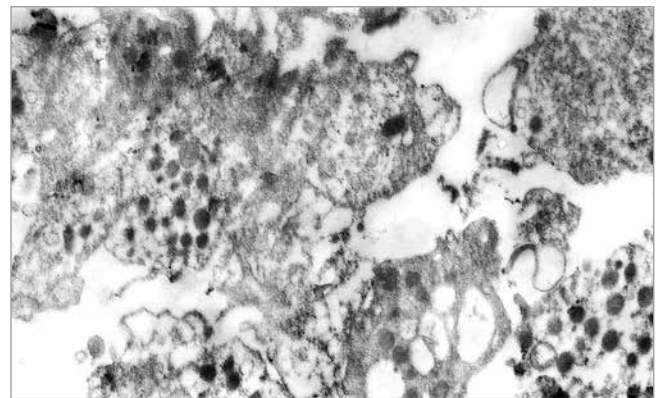


Рис. 4. Нейтрофильный синцитий с вакуолизацией некоторых клеток в крови пациента с COVID-19. ТЭМ, $\times 8000$

Fig. 4. Neutrophilic syncytium with vacuolation of some cells in the blood of a patient with COVID-19. TEM, $\times 8000$

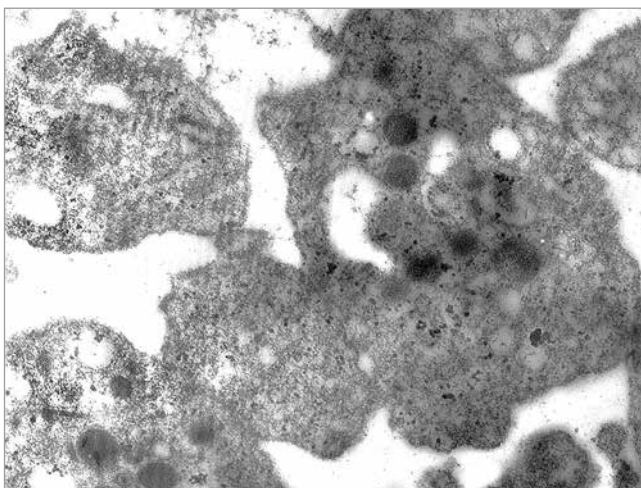


Рис. 5. Нейтрофильный синцитий в крови пациента с COVID-19, где прослеживаются все этапы его формирования. ТЭМ, $\times 10\ 000$

Fig. 5. Neutrophil syncytium in the blood of a patient with COVID-19, where all stages of its formation are traced. TEM, $\times 10\ 000$

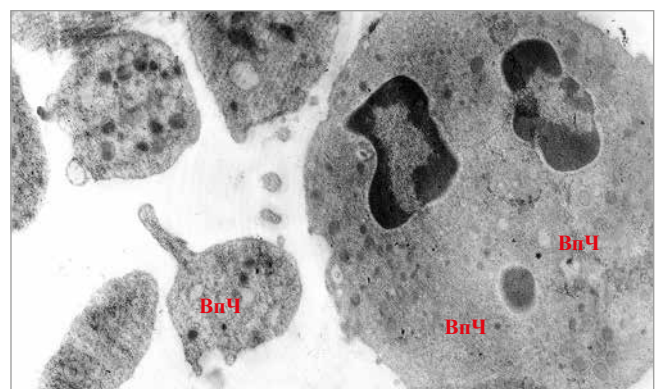


Рис. 6. Нейтрофильный синцитий в крови пациента с COVID-19, в некоторых клетках видны вирусоподобные частицы (ВпЧ). ТЭМ, $\times 6000$

Fig. 6. Neutrophil syncytium in the blood of a patient with COVID-19, with virus-like particles being visible in some cells (VIP). TEM, $\times 6000$

SICs, и была показана его связь с трансформацией клеток [11, 13]. Формирование SICs относится к процессу активного проникновения одной или нескольких клеток в другую клетку, образуя уникальную структуру с различными биологическими эффектами [14]. Входящие клетки, также называемые эффекторными клетками, могут подвергаться митозу внутри внешних клеток, называемых клетками-мишенями, высвободиться или даже сливаться с клетками-мишенями. Но большинство интернализированных эффекторных клеток подвергается клеточной гибели внутри клетки-мишени, называемой энтозом (entosis), который можно рассматривать как проявление общего биологического феномена – гибелью «клетки в клетке» [15, 16]. Энтоз был даже принят Номенклатурным комитетом по клеточной гибели как новая форма клеточной смерти [17], что вызвало большой интерес ученых во всем мире к исследованию этого явления.

У человека в норме синцитиально связанные между собой клетки сохранились в семеннике, где эти связи синхронизируют процессы сперматогенеза [14]. SICs могут широко встречаться при опухолях, аутоиммунных заболеваниях, заболеваниях крови, вирусных инфекциях, в том числе при ВИЧ-инфекции, гепатите, инфицировании вирусом Эпштейна–Барр, респираторно-синцитиальный вирусной пневмонии [14, 18, 19], а также при COVID-19 [12]. Исследование различных воспаленных тканей показало, что почти все они имеют SICs различного количества и формы [20]. Как справедливо заметил X. Wang, большинство патологоанатомов замечали много таких структур, но не обращали на них особого внимания, что отражает тезис о том, что синцитии широко распространены в тканях с патологиями различного генеза [14]. В связи с этим следует отметить, что в прекрасно иллюстрированном атласе «Патологическая анатомия COVID-19» [21] в ткани легких можно заметить синцитиальные образования (см. рис. 43–45), не упомянутые авторами в тексте.

Предполагается, что синцитии являются определяющей патологической характеристикой COVID-19 [4, 22]. Количество синцитиев и структур «клетка в клетке» отрицательно коррелировало с количеством лимфоцитов в периферической крови пациентов, и это указывало на то, что синцитий может служить единицей истощения лимфоцитов, предположительно способствуя лимфоцитопении у пациентов с COVID-19 [4].

Наибольший интерес вызывает сообщение, что образование синцитиев, опосредованное спайковым гликопротеином S во время инфицирования вирусом SARS-CoV-2, может способствовать cell-to-cell распространению вируса, причем показано, что спайк SARS-CoV-2 более эффективно способствует передаче вируса от клетки к клетке, чем спайк SARS-CoV [23]. Установлено, что при распространении оболочечных вирусов посредством межклеточных (cell-to-cell) контактов увеличивается локальная плотность вирусных частиц [23], приводящая к эффективному переносу ви-

русов в соседние клетки [24]. Кроме того, cell-to-cell передача способна обеспечить уклонение SARS-CoV-2 от нейтрализации антителами, что объясняет эффективное распространение коронавируса и патогенез инфекции, как это было ранее показано для ВИЧ, вируса гепатита С и вируса Эбола [25–28].

A.G. Harrison et al. [29], отмечая у пациентов с COVID-19 часто наблюдаемые выраженные гриппоподобные симптомы, которые прогрессировали до тяжелой пневмонии, подтвердили раннее предположение, что легкие являются основным органом-мишенью для проявления висцеротропизма SARS-CoV-2 [30]. Относительно SARS-CoV показано, что как только коронавирус попадает в организм хозяина через дыхательные пути, альвеолярные эпителиальные клетки, сосудистые эндотелиальные клетки и альвеолярные макрофаги становятся одними из первых мишеней для проникновения этого патогена [31, 32]. Указанные клетки, вероятно, являются «нулевой точкой» для ранней инфекции и репликации коронавирусов из-за их экспрессии ACE2 [33] с последующим прогрессированием до опасного для жизни системного воспаления и полиорганной дисфункции [34, 35]. Исследование Z. Varga et al. продемонстрировало прямое инфицирование SARS-CoV-2 эндотелиальных клеток сосудов с сопутствующим накоплением воспалительных нейтрофилов и моноклеарных клеток во многих органах (легкие, сердце, почки, тонкая кишка и печень) у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [36]. Заслуживает внимания предположение H. Li et al. [37], что поражение легких и других органов при диссеминированном SARS-CoV-2, а также вызванные цитокиновым штормом иммунные нарушения и нарушения микроциркуляции в совокупности приводят к вирусному сепсису. J. Beltrán-García et al. [38], E. Karakike et al. [39] подтверждают, что у большинства инфицированных SARS-CoV-2 пациентов, поступивших в отделения интенсивной терапии, тяжелое заболевание соответствовало критериям сепсиса и септического шока.

Заключение

Наличие вирусиндуцированных синцитиев окончательно доказано *in vitro* в тканях и органах хозяина во время естественного течения инфекций, вызываемых оболочечными вирусами нескольких семейств, включая основные вирусные патогены человека, такие как ВИЧ-1, SARS-CoV-2 и вирусы герпеса, а также некоторых представителей *Paramyxoviridae* (например, вирус кори и респираторно-синцитиальный вирус). Однако для большинства этих вирусов до сих пор обсуждаются данные *in vivo* о роли и функциях этих синцитиев в распространении вирусов, вирулентности и даже персистенции вирусов при естественном течении инфекции у их природных хозяев.

В доступных источниках литературы мы не встретили сообщений о фузогенной способности возбудителей инфекций, включая возбудитель COVID-19,

коронавирус SARS-CoV-2, относительно лейкоцитов периферической крови. Отмеченные выше патогенетические особенности коронавирусных инфекций позволяют высказать предположение, что выявленное нами формирование нейтрофильных синцитиев в периферической крови пациентов с COVID-19 создает условия для развития вирусемии, гематогенной диссеминации коронавируса и генерализации инфекции с развитием полиорганной патологии. Полученные в настоящей работе результаты восполняют знания о патогенезе COVID-19, акцентируя внимание на возможном гематогенном пути диссеминации SARS-CoV-2 из входных ворот инфекции. Выявление нейтрофильных синцитиев в крови пациентов с этой инфекцией имеет практическое значение в плане прогнозирования тяжелого, септического течения COVID-19 и его своевременного лечения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Сомова.
Обработка и анализ материала – Е.И. Дробот, С.А. Абрамова, Л.М. Сомова, Е.В. Пустовалов, И.Н. Ляпун.
Написание текста – Л.М. Сомова.
Редактирование – Л.М. Сомова, М.Ю. Щелканов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Somova.
Material processing and performed the analysis – E.I. Drobot, S.A. Abramova, L.M. Somova, E.V. Pustovalov, I.N. Lyapun.
Wrote the paper – L.M. Somova.
Editing the manuscript – L.M. Somova, M.Yu. Shchelkanov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–3. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- Щелканов М.Ю. Этиология COVID-19. В кн.: О.А. Бургасова, В.В. Никифоров (ред.). COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики: Руководство для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. С. 11–53. DOI: 10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288.
Shchelkanov MYu. Etiology of COVID-19. In: O.A. Burgasova, V.V. Nikiforov (eds.). COVID-19: from etiology to vaccine prevention: Guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media, 2023. P. 11–53 (In Russ.). DOI: 10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
- Zhang Z, Zheng Y, Niu Z, Zhang B, Wang C, Yao X et al. SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination. *Cell Death Differ*. 2021;28(9):2765–77. DOI: 10.1038/s41418-021-00782-3.
- Braga L, Ali H, Secco I, Chiavacci E, Neves G, Goldhill D et al. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature*. 2021;594(7861):88–93. DOI: 10.1038/s41586-021-03491-6.
- Buchrieser J, Dufloo J, Hubert M, Monel B, Planas D, Rajah MM et al. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J*. 2020;39(23):e106267. DOI: 10.15252/embj.2020106267.
- Jiang X, Zhang Z, Wang C, Ren H, Gao L, Peng H et al. Bimodular effects of D614G mutation on the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 enhance protein processing, membrane fusion, and viral infectivity. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):268. DOI: 10.1038/s41392-020-00392-4.
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bull World Health Organ*. 2001;79(4):373–4. PMID: 11357217.
- Сомова Л.М., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В., Абрамова С.А., Плехова Н.Г., Симакова А.И. и др. Морфология лейкоцитов периферической крови у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(3):41–49. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.41-49.
Somova LM, Drobot EI, Pustovalov EV, Abramova SA, Plekhova NG, Simakova AI et al. Morphology of peripheral blood leukocytes in patients with new coronavirus infection (COVID-19). Clinical and experimental morphology. 2023;12(3):41–49 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.41-49
- Huang H, Chen Z, Sun Q. Mammalian cell competitions, cell-in-cell phenomena and their biomedical implications. *Curr Mol Med*. 2015;15(9):852–60. DOI: 10.2174/1566524015666151026101101.
- Sun Q, Chen W. Cell-in-cell: an emerging player in COVID-19 and immune disorders. *Natl Sci Open*. 2022;1(1):20220001. DOI: 10.1360/nso/20220001.
- Overholtzer M, Brugge JS. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(10):796–809. DOI: 10.1038/nrm2504.
- Wang X. Cell-in-cell phenomenon: a new paradigm in life sciences. *Curr Mol Med*. 2015;15(9):810–8. DOI: 10.2174/1566524015666151026095730.
- Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*. 2007;131(5):966–79. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.040.
- Wang S, Guo Z, Xia P, Liu T, Wang J, Li S et al. Internalization of NK cells into tumor cells requires ezrin and leads to programmed cell-in-cell death. *Cell Res*. 2009;19(12):1350–62. DOI: 10.1038/cr.2009.114.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3–11. DOI: 10.1038/cdd.2008.150.

18. Ni C, Chen Y, Zeng M, Pei R, Du Y, Tang L et al. In-cell infection: a novel pathway for Epstein-Barr virus infection mediated by cell-in-cell structures. *Cell Res.* 2015;25(7):785–800. DOI: 10.1038/cr.2015.50.
19. Ni C, Huang L, Chen Y, He M, Hu Y, Liu S et al. Implication of cell-in-cell structures in the transmission of HIV virus to epithelial cells. *Cell Res.* 2015;25(11):1265–8. DOI: 10.1038/cr.2015.119.
20. Chen YH, Wang S, He MF, Wang Y, Zhao H, Zhu HY et al. Prevalence of heterotypic tumor/immune cell-in-cell structure in vitro and in vivo leading to formation of aneuploidy. *PLoS One.* 2013;8(3):e59418. DOI: 10.1371/journal.pone.0059418.
21. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Крупнов Н.М. и др. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас / Под ред. О.В. Зайратьянца. Москва: ГБУ НИИОЗММ ДЗМ, 2020. 140 с.
Zayratyants OV, Samsonova MV, Mikhaleva LM, Chernyaev AL, Mishnev OD, Krupnov NM et al. COVID-19 anatomical pathology: Atlas / Ed. by O.V. Zayratyants. Moscow: GBU NIIOZMM (Research Institute of Health Organization and Medical Management of the Moscow Department of Health), 2020. 140 p. (In Russ.).
22. Zheng Y, Zhou LL, Su Y, Sun Q. Cell fusion in the pathogenesis of COVID-19. *Mil Med Res.* 2021;8(1):68. DOI: 10.1186/s40779-021-00348-x.
23. Zeng C, Evans JP, King T, Zheng YM, Oltz EM, Whelan SPJ et al. SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;119(1):e2111400119. DOI: 10.1073/pnas.2111400119.
24. Zhong P, Agosto LM, Munro JB, Mothes W. Cell-to-cell transmission of viruses. *Curr Opin Virol.* 2013;3(1):44–50. DOI: 10.1016/j.coviro.2012.11.004.
25. Mothes W, Sherer NM, Jin J, Zhong P. Virus cell-to-cell transmission. *J Virol.* 2010;84(17):8360–8. DOI: 10.1128/JVI.00443-10.
26. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV et al. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol.* 2011;85(1):596–605. DOI: 10.1128/JVI.01592-10.
27. Li H, Zony C, Chen P, Chen BK. Reduced potency and incomplete neutralization of broadly neutralizing antibodies against cell-to-cell transmission of HIV-1 with transmitted founder Envs. *J Virol.* 2017;91(9):e02425–16. DOI: 10.1128/JVI.02425-16.
28. Miao C, Li M, Zheng YM, Cohen FS, Liu SL. Cell-cell contact promotes Ebola virus GP-mediated infection. *Virology.* 2016;488:202–15. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.019.
29. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100–15. DOI: 10.1016/j.it.2020.10.004.
30. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, Dorjbal B, Truong R, Derse D et al. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One.* 2013;8(1):e53138. DOI: 10.1371/journal.pone.0053138.
31. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* 2003;361(9371):1767–72. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)13412-5.
32. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol.* 2005;79(23):14614–21. DOI: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005.
33. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 2005;11(8):875–9. DOI: 10.1038/nm1267.
34. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* 2020;181(5):1016–35. e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
35. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061–9. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.
36. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 2020;395(10234):1417–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
37. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet.* 2020;395(10235):1517–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30920-X.
38. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Pallardó FV, Ferreres J, Rodríguez M, Mulet S et al. Sepsis and coronavirus disease 2019: common features and anti-inflammatory therapeutic approaches. *Crit Care Med.* 2020;48(12):1841–4. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004625.
39. Karakike E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kyprianou M, Fleischmann-Struzek C, Pletz MW, Netea MG et al. Coronavirus disease 2019 as cause of viral sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2021;49(12):2042–57. DOI: 10.1097/CCM.0000000000005195.

Информация об авторах

Лариса Михайловна Сомова – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Светлана Алексеевна Абрамова – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Елена Игоревна Дробот – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Евгений Владиславович Пустовалов – доктор физико-математических наук, ведущий инженер лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, профессор департамента информационных и компьютерных систем Дальневосточного федерального университета.

Ирина Николаевна Ляпун – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Михаил Юрьевич Щелканов – доктор биологических наук, доцент, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета; ведущий научный сотрудник лаборатории морских млекопитающих Национального научного центра морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Author information

Larisa M. Somova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Head of Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Svetlana A. Abramova – Junior Researcher, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Elena I. Drobot – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Evgeny V. Pustovalov – Dr. Sci. (Phys. and Math.), Leading Engineer, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Software and Computer Systems, Far Eastern Federal University.

<http://orcid.org/0000-0003-1036-3975>

Irina N. Lyapun – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathomorphology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Mikhail Yu. Shchelkanov – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Director of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology; Head of the Department of Epidemiology, Microbiology and Parasitology, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University; Leading Researcher, Laboratory of Marine Mammals, A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch.

<https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Формирование транзиторных зон в дорсомедиальной и дорсолатеральной неокортикальных областях в раннем развитии человека

А.Е. Прощина, А.С. Харламова, Ю.С. Кривова, О.С. Годовалова, С.В. Савельев

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

Резюме. Введение. В ходе гистогенеза коры головного мозга в стенке полушарий возникают транзиторные зоны, которые исчезают в процессе развития, замещаясь зрелым серым и белым веществом. Работы по изучению раннего кортикогенеза человека фрагментарны, что приводит к различиям в определении сроков формирования этих зон. Целью исследования было охарактеризовать раннюю стратификацию транзиторных зон и уточнить сроки их формирования в дорсолатеральной и дорсомедиальной частях неокортекса на 3–4-м месяце внутриутробного развития человека.

Материалы и методы. Исследование выполнено на аутопсийном материале головного мозга 12 эмбрионов и плодов человека на 8–15-й неделях после оплодотворения с помощью гистологического окрашивания серийных срезов по Нисслию, Маллори и гематоксилином и эозином с последующим морфометрическим и статистическим анализом.

Результаты. При формировании стенки полушарий и неокортикальной закладки плодов происходит последовательное увеличение числа транзиторных зон. Формирование зон медиальной стенки полушария запаздывает по сравнению с формированием латеральной.

Заключение. При формировании транзиторных зон в дорсомедиальной и дорсолатеральной неокортикальных областях существуют региональные гетерохронии, что является одной из возможных причин дифференцировки полей неокортекса и требует отдельного углубленного изучения.

Ключевые слова: транзиторные зоны, неокортекс, нейрогенез, кортикогенез, пренатальное развитие человека

Для корреспонденции: Александра Евгеньевна Прощина. E-mail: proshchina@yandex.ru

Для цитирования: Прощина А.Е., Харламова А.С., Кривова Ю.С., Годовалова О.С., Савельев С.В. Формирование транзиторных зон в дорсомедиальной и дорсолатеральной неокортикальных областях в раннем развитии человека. Клин. эксп. морфология. 2024;13(3):34–41. DOI: 10.31088/SEM2024.13.3.34-41.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00172.

Статья поступила 29.11.2023. Получена после рецензирования 09.01.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Delineation of transient zones in dorsolateral and dorsomedial neocortical areas in early human development

A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova, Yu. S. Krivova, O.S. Godovalova, S.V. Saveliev

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

Abstract. Introduction. Transient zones form during prenatal corticogenesis and disappear and are replaced by mature white and gray matter in postnatal ontogenesis. The growth trajectories of transient zones have not been completely characterized, and quantitative data describing these processes are still scarce. We aimed to describe the hemispheric wall stratification during 3–4 months of intrauterine development and clarify timing of major transient zone formation in dorsolateral and dorsomedial neocortical areas.

Materials and methods. We examined 12 autopsy brain samples of human fetuses at postcoital weeks 8–15. Nissl, Mallory trichrome, and haematoxylin and eosin histological preparations were analyzed. Then we performed morphometric and statistical analyses.

Results. Consecutive formation and growth of transient zones in hemispheric walls occur during early prenatal development at postcoital weeks 8–15. Nissl, Mallory trichrome, and haematoxylin and eosin histological

preparations were analyzed. In the dorsomedial hemispheric wall, the development of transient zones is delayed compared to that in the dorsolateral one.

Conclusion. The formation of transient zones in dorsomedial and dorsolateral hemispheric walls is characterized by regional heterochrony, which could account for neocortical area differentiation and needs further research.

Keywords: transient zones, neocortex, neurogenesis, corticogenesis, human prenatal development

Corresponding author: Alexandra E. Proshchina. E-mail: proshchina@yandex.ru

For citation: Proshchina A.E., Kharlamova A.S., Krivova Yu.S., Godovalova O.S., Saveliev S.V. Delineation of transient zones in dorsolateral and dorsomedial neocortical areas in early human development. *Clin. exp. morphology.* 2024;13(3):34–41 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.34-41.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-15-00172.

Received 29.11.2023. **Received in revised form** 09.01.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Во время пренатального кортикогенеза в стенках полушарий переднего мозга существуют транзиторные зоны (ТЗ). В этих зонах проходят основные морфогенетические процессы. Впоследствии ТЗ исчезают и заменяются зрелым серым и белым веществом [1–5].

За счет ТЗ стенка полушарий переднего мозга плодов обладает выраженной стратификацией. В настоящее время согласно эмбриологической терминологии выделяют следующие основные зоны: вентрикулярную (*zona ventricularis*, *matrix germinalis*, ВЗ), субвентрикулярную (*zona subventricularis*, СВЗ), интрамедиальную (*zona intermedia*, ИЗ), кортикальную пластинку (*lamina corticalis*, КП) и маргинальную (*zona marginalis*, МЗ) [6–8]. Наряду с этим дополнительно выделяют зону, лежащую под КП, – субпластинку (подкорковую пластинку) (*zona sublaminae*, СП), а в МЗ отдельно определяют субпиальный гранулярный (зернистый) слой (*stratum granulare subpiale*, СГС) [7]. СВЗ подразделяют на внутреннюю зону (*zona subventricularis interna*) и внешнюю зону (*zona subventricularis externa*). Кроме этого, на самых ранних этапах развития введен отдельный термин предпластинка (*prelamina*, ПП) – примордиальный плексиморфный слой над ВЗ [8].

Основная проблема в изучении ТЗ связана с тем, что большая часть новых данных получена на грызунах [3]. Очевидно, что существует целый ряд важных отличий в развитии коры головного мозга грызунов и человека [9]. Исследования кортикогенеза человека проводятся небольшим числом научных групп на ограниченном материале. Траектории роста ТЗ у человека полностью не охарактеризованы, и количественные данные, описывающие эти процессы, все еще фрагментарны [4].

Целью исследования было охарактеризовать раннюю стратификацию ТЗ и уточнить сроки их формирования в дорсолатеральной и дорсомедиальной частях неокортекса на 3–4-м месяце внутриутробного развития человека.

Материалы и методы

Работа выполнена на аутопсийном материале головного мозга 12 эмбрионов и плодов человека 8–15 недель после оплодотворения из коллекции лаборатории

развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского [10]. Материал собран после хирургических плановых аборт и прерывания беременности по медицинским показаниям. Работа одобрена локальным этическим комитетом НИИ морфологии человека (№ 3, 17.01.2006, № 33(9), 07.02.2022). Возраст эмбрионов и плодов оценивали на основании анамнеза (дата последней менструации, протоколы ультразвукового исследования), а затем уточняли по весу/росту и теменно-копчиковой длине в соответствии с таблицами определения возраста для эмбриональной [11] и фетальной [12] стадий.

В зависимости от возраста плодов получали гистологические препараты головы целиком, всего мозга или только одного из полушарий. Образцы фиксировали в 4% кислотом или забуференном формалине (рН 7,4). Серийные парафиновые срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори или крезильовым фиолетовым по Нисслию для обзора цитохимии.

Полученные препараты сканировали при помощи модифицированного комплекса МЕКОС-Ц2 («МЕКОС», Россия) на базе микроскопа Zeiss Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива $\times 20$.

Рассмотрены строение и особенности формирования ТЗ в средней части мозга в дорсомедиальной и дорсолатеральной частях формирующейся новой коры на уровне латерального и медиального возвышений латеральных желудочков (*eminentia ventricularis (ganglionaris) medialis et lateralis*), хвостатого ядра (*nucleus caudatus*) и скорлупы (*putamen*). Границы дорсомедиальной неокортикальной области были определены по Филимонову [13]. Границы ТЗ на оцифрованных срезах определяли по двум основным признакам (плотность клеток и полярность ядер) [3].

При помощи инструментов анализа программы Aperio Image Scope v.12.3.3 (2021 Leica Biosystems Imaging, Германия) на отсканированных препаратах срезов мозга четырех плодов (21-я стадия развития по Карнеги, 11-я, 13-я и 15-я неделя после оплодотворения) были проведены измерения ширины стенки

полушария, ВЗ и собственно КП в дорсомедиальной и дорсолатеральной областях. Для каждого срока брали не менее пяти срезов, в которых проводили не меньше 10 измерений отдельно для каждой из структур. Так как абсолютный размер может колебаться от уровня сжатия в зависимости от сохранности материала и способа проводки, подсчитывали соотношения средних величин указанных показателей друг к другу.

Статистический анализ проводили в программе Statistica 10 (Statsoft, США). Для анализа ширины слоев и их соотношений использовали непараметрический тест ANOVA Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением средних рангов. Непараметрический тест Уилкоксона для парных данных был использован для сравнения величин в одном и том же образце. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты

На 20-й стадии по Карнеги (49 дней после оплодотворения) латеральную стенку полушарий составляют три четко различимые зоны: на границе с желудочком расположена густоклеточная ВЗ, затем идет более разреженная клеточная зона ПП, третья зона практически не содержит клеточных ядер. В медиальной стенке на этом сроке можно выявить только две зоны: пролиферативную и нейромезенхимы.

Однако уже на 21-й стадии по Карнеги (50–52 дня после оплодотворения) начинается процесс первичного обособления КП. В дорсомедиальной части стенки полушария исследованной области выражены только три зоны (рис. 1 А, В): ВЗ, ПП и зона нейромезенхимы, тогда как в дорсолатеральной части уже можно выделить характерную структуру, организованную в пять ТЗ (рис. 1 С). Нижнюю часть стенки полушария, граничащую с полостью желудочка, образует ВЗ, в которой плотно расположены тела клеток; выше находится более разреженная СВЗ. Далее выявляется бедная клеточными элементами ИЗ. Процесс формирования КП начинается в вентролатеральной части полушарий. Цитоархитектоника корковой закладки на этом сроке довольно проста и состоит из двух выраженных слоев клеток. Над ИЗ зоной располагается собственно недифференцированная КП, а над ней хорошо различим краевой слой – светлая МЗ. На этом сроке развития ширина закладки КП меньше ширины ВЗ (табл. 1). Дорсомедиальная часть стенки полушария уже, чем дорсолатеральная, на всем протяжении исследованной области ($p=0,0003$).

Период формирования КП продолжается на 11-й неделе после оплодотворения. В областях формирования неокортекса ВЗ, СВЗ, ИЗ, КП и МЗ выявлены как в дорсомедиальной, так и в дорсолатеральной частях стенок полушарий (рис. 1 В, С). Ширина КП была значительно больше, чем ВЗ (табл. 1) ($p=0,005$). По сравнению с плодами на 21-й стадии Карнеги ширина стенок увеличилась в 1,5–2 раза. В этот период в латеральной

стенке уже видно разделение СВЗ на две подзоны – разреженную внешнюю и плотную внутреннюю части. Над СВЗ лежит довольно широкий малоклеточный участок ИЗ.

Начиная с 11-й недели после оплодотворения в неокортексе выявлена первичная дифференцировка КП.

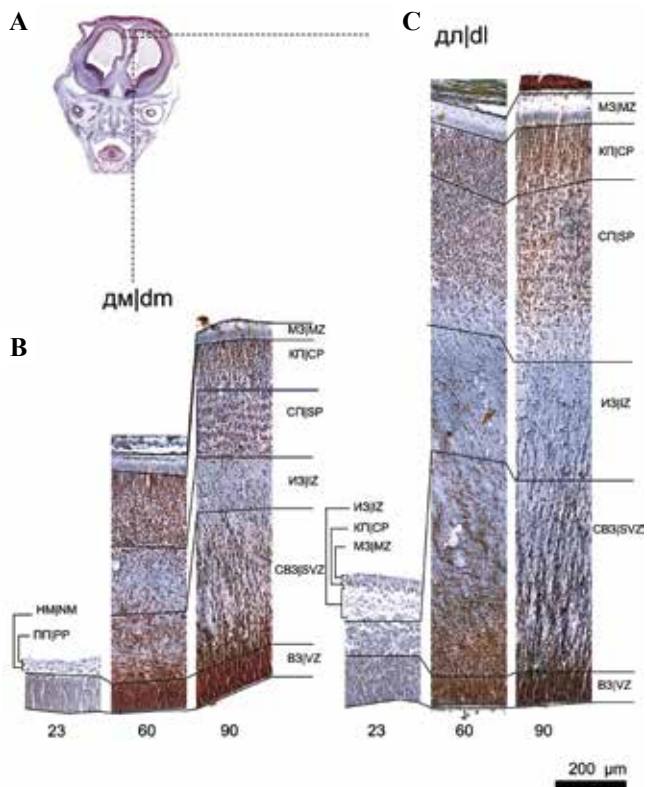


Рис. 1. Формирование основных транзиторных зон стенки больших полушарий у плодов 23, 60 и 90 мм теменно-копчиковой длины.

А – корональный срез через голову плода 60 мм, выделены участки, показанные на слайдах В и С; В – участок дорсомедиальной стенки (дм), С – участок дорсолатеральной стенки (дл). Окраска по Маллори. Изображения в более высоком разрешении можно посмотреть на сайте <https://brainmorphology.science/ru/>
ПП – предпластинка, НМ – нейромезенхима, ВЗ – вентрикулярная зона, СВЗ – субвентрикулярная зона, ИЗ – интермедиальная зона, СП – субпластинка, КП – кортикальная пластинка, МЗ – маргинальная зона

Fig. 1. The formation of main transient zones of hemispheric walls in the fetal brains of 23, 60, and 90 mm crown-rump length.

А – schematic presentation of the section level on coronal sections through the head of the fetus 60 mm (unscaled), the areas shown in slides B and C are marked with rectangles; В – sections of the dorsomedial wall (dm); С – sections of the dorsolateral wall (dl). Mallory stain. High-resolution section images are at <https://brainmorphology.science/>
PP – preplate, NM – neuromesenchyme, VZ – ventricular zone, SVZ – subventricular zone, IZ – intermediate zone, SP – subplate, CP – cortical plate, MZ – marginal zone

Таблица 1 | Table 1

**Ширина (мкм) основных транзитных зон в дорсомедиальной и дорсолатеральной частях стенки полушарий.
Me (Q1–Q3) | The thickness (μm) of main transient zones in dorsomedial and dorsolateral hemispheric walls. Me (Q1–Q3)**

	23 мм 23 mm	60 мм 60 mm	90 мм 90 mm	115 мм 115 mm	Тест Краскела–Уоллеса, p Kruskal–Wallis test, p
Сдм Cdm	175 (144–192) d	578 (550–740)	412 (412–937)	1557 (1488–1595) a	0,006
Сдл Wdl	236 (207–258) d	1085 (1082–1088) d	1487 (1445–1492)	3085 (2822–3127) a, b	0,001
ВЗдм VZdm	101 (82–112)	103 (90–110)	67,5 (65–67,5) d	116 (95–148) c	0,05
ВЗдл VZdl	128 (87–157)	102,5 (100–142)	80 (80–103)	100 (93–118)	0,35
КПдм CPdm	0 b	198 (190–208) a	113 (103–175)	245 (230–270)	0,006
КПдл CPdl	39 (36–44) d	315 (313–320)	148 (140–155) d	383 (338–395) a, c	0,002

* различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) при множественных сравнениях значений p (выделены жирным шрифтом) у обозначенных плодов по сравнению с: a – плод, ТКД – 23 мм, b – 60 мм, c – 90 мм, d – 115 мм; ТКД – теменно-копчиковая длина, дм – дорсомедиальная, дл – дорсолатеральная, С – стенка полушария, ВЗ – желудочковая зона, КП – кортикальная пластинка

* the differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) in the Multiple Comparisons p values (bold) in designated fetuses compared to: a – fetus, CRL – 23 mm, b – 60 mm, c – 90 mm, d – 115 mm; CRL – crown-rump length, dm – dorsomedial, dl – dorsolateral, W – hemispheric wall, VZ – ventricular zone, CP – cortical plate

В вентролатеральной части КП началось разделение на два слоя с более плотным расположением клеток в верхнем слое и более разреженным в нижнем. Верхний слой был уже нижнего. Однако такое расслоение еще не было обнаружено в дорсолатеральной и дорсомедиальной частях стенок полушарий (рис. 1 В, С). Дорсомедиальная часть была значительно уже дорсолатеральной ($p=0,04$), в то время как ширина ВЗ в них существенно не различалась (рис. 1). На этом сроке развития в МЗ наблюдалось появление СГС, состоящего из мелких клеток. Прежде всего, он появляется на вентролатеральной поверхности головного мозга плода, в области сильвиевой ямки (будущая островковая кора).

В течение 12–15-й недель после оплодотворения процессы, описанные выше, продолжались, и стало возможным четко идентифицировать полосу тангенциально ориентированных волокон, растущих в СВЗ, которая делит ее на внутренний (ближе к ВЗ) и внешний подслои в вентролатеральной части стенки полушария. В латеральной части СП на 13-й неделе после оплодотворения выявлено разделение на два подслоя с более плотным расположением клеток в верхнем слое (ближе к КП) и с более разреженным в нижнем.

Четкие границы наблюдались между подслоями СВЗ и между внешним слоем СВЗ и ИЗ из-за роста волокон на 14-й неделе после оплодотворения. Самыми широкими зонами стенки полушария были СВЗ, ИЗ и СП. В пределах данных зон прослежены

радиальные и тангенциальные пути миграции. КП на этом сроке состоит из плотных вертикальных рядов нейробластов. В СП и КП становятся хорошо видны колонки радиальной миграции нейробластов. В течение 14–15-й недель после оплодотворения выявлено дальнейшее врастание волокон в СВЗ и заметное увеличение ширины СП.

Ширина стенок полушарий увеличивалась с возрастом, но это увеличение происходило неравномерно. Дорсолатеральная часть стенки в период формирования неокортекса была шире дорсомедиальной на всех изученных периодах развития (табл. 1).

Средняя ширина ВЗ на сроке 11–15 недель после оплодотворения в дорсомедиальной и дорсолатеральной частях достоверно не отличалась, в то время как КП была в 1,5–2 раза шире в дорсолатеральной части по сравнению с дорсомедиальной. Кроме этого наблюдалось значительное увеличение ширины дорсолатеральной части стенки полушария в процессе развития с 8-й до 15-ю неделю после оплодотворения ($p=0,0008$). Это сопровождалось уменьшением ширины ВЗ и увеличением КП ($p=0,0016$). Таким образом, в конце эмбрионального – начале раннеплодного периодов развития отношение ширины ВЗ к КП в дорсолатеральной части уменьшалось ($p=0,005$). Ширина дорсомедиальной части стенки полушария увеличивалась ($p=0,006$). Однако тут изменения, происходящие в ВЗ и КП, были менее выражены и соотношение их толщины существенно не изменялось (табл. 2).

Соотношение основных транзиторных зон в дорсомедиальной и дорсолатеральной стенках полушарий. Ме (Q1–Q3) |
The ratio of the main transient zones in the dorsomedial and dorsolateral hemispheric walls. Me (Q1–Q3)

	23 мм 23 mm	60 мм 60 mm	90 мм 90 mm	115 мм 115 mm	Тест Краскела–Уоллеса, p Kruskal–Wallis test, p
Сдм/Сдл Wdm/Wdl	0,74 (0,7–0,8)	0,53 (0,52–0,67)	0,29 (0,26–0,75)	0,51 (0,49–0,6)	0,115
ВЗдм/ВЗдл VZdm/VZdl	0,71 (0,58–1,28)	1 (0,76–1,07)	0,75 (0,63–0,84)	1,06 (0,96–1,55)	0,252
КПдм/КПдл CPdm/CPdl	0 c	0,63 (0,61–0,65)	0,83 (0,66–1,06)	0,67 (0,59–0,68)	0,024
ВЗдм/КПдм VZdm/CPdm	N	0,51 (0,45–0,56)	0,6 (0,57–0,66)	0,49 (0,39–0,55)	0,492
ВЗдл/КПдл VZdl/CPdl	3,18 (2,4–4,12) d	0,32 (0,3–0,44)	0,57 (0,54–0,75)	0,27 (0,26–0,29) a	0,005
ВЗдм/Сдм VZdm/Wdm	0,58 (0,57–0,58) d	0,162 (0,15–0,19)	0,16 (0,11–0,17)	0,09 (0,06–0,13) a	0,025
ВЗдл/Сдл VZdl/Wdl	0,6 (0,35–0,68) d	0,09 (0,09–0,13) d	0,07 (0,06–0,08)	0,03 (0,03–0,04) a, b	0,019
КПдм/Сдм CPdm/Wdm	0 b	0,32 (0,32–0,34) a	0,22 (0,17–0,25)	0,16 (0,15–0,17)	0,004
КПдл/Сдл CPdl/Wdl	0,15 (0,15–0,21)	0,292 (0,29–0,29) c	0,1 (0,1–0,1) b	0,12 (0,1–0,13)	0,001

* различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) при множественных сравнениях значений p (выделены жирным шрифтом) у обозначенных плодов по сравнению с: a – плод, ТКД – 23 мм, b – 60 мм, c – 90 мм, d – 115 мм; ТКД – теменно-копчиковая длина, дм – дорсомедиальная, дл – дорсолатеральная, С – стенка полушария, ВЗ – желудочковая зона, КП – кортикальная пластинка

* the differences are statistically significant ($p \leq 0,05$) in the Multiple Comparisons p values (bold) in designated fetuses compared to: a – fetus, CRL – 23 mm, b – 60 mm, c – 90 mm, d – 115 mm; CRL – crown-rump length, dm – dorsomedial, dl – dorsolateral, W – hemispheric wall, VZ – ventricular zone, CP – cortical plate

Обсуждение

Гистологическое описание. В работе Г.И. Полякова [2] изучаемый период относится к раннему формированию неокортекса. Этот период характеризуется процессами миграции и консолидации КП.

В целом, полученные нами результаты согласуются с данными других исследований раннего развития мозга человека [1–3, 14, 15]. Первоначально зачаток переднего мозга состоит из делящихся нейроэпителиальных клеток. Эти пролиферирующие клетки образуют ВЗ [3, 8]. Ранняя пролиферация увеличивает площадь поверхности и ширину ВЗ [3, 16]. После начала нейрогенеза на границе ВЗ начинают появляться делящиеся клетки. Накопление этих промежуточных или базальных предшественников создает отчетливое новое отделение над ВЗ – СВЗ [8]. Многие специалисты предполагают, что СВЗ появляется только после начала формирования КП, однако последние сообщения указывают на то, что СВЗ возникает несколько раньше [3]. На наших препаратах как КП, так и СВЗ можно было отчетливо идентифицировать в латеральной стенке полушарий эмбрионов уже на 21-й стадии по Карнеги, при этом границы СВЗ

вдоль стенки простирались немного дальше КП, что подтверждает эту точку зрения. ВЗ и СВЗ считаются основными пролиферативными зонами стенки головного мозга плода [3, 16]. На более поздних стадиях развития (по прошествии 10 недель после оплодотворения) полоса тангенциально ориентированных волокон делит СВЗ на внутренний и внешний подслои.

Формирование новой коры головного мозга млекопитающих начинается с образования примордиального плексиморфного слоя – предпластинки над ВЗ. ПП состоит из тангенциально расположенных афферентных и эфферентных волокон и тел нейронов, в том числе клеток Кахалы–Ретциуса [3]. Тела нейроэпителиальных клеток простираются вплоть до оболочек, пока первые нейробласты не вторгаются тангенциально, непосредственно под поверхность, чтобы инициировать формирование ПП, поэтому в современной терминологии словосочетание «маргинальная зона» не используется до начала формирования КП [3, 8]. Этот термин теперь предлагается применять только для обозначения части бывшей ПП, которая лежит над формирующейся КП и позже становится слоем 1 зрелой коры [3, 14].

Непосредственно КП представляет собой компактный, четко очерченный слой. Сначала КП появляется в латеральной области стенки полушария (в области сильвиевой ямки) [2, 14]. На наших препаратах КП четко определялась в латеральной стенке полушарий уже на 21-й стадии, что соответствует некоторым данным литературы [16].

В ранних номенклатурах нейронный компартмент СП между КП и ИЗ не выделялся (несмотря на то, что он был описан ранее, в том числе в 1937 году Г.И. Поляковым [2]). Однако эта зона была вновь открыта сначала у людей, а затем и у обезьян. СП играет ключевую роль в развитии нервной системы как «зона ожидания» для растущих корковых афферентов [3, 5]. На ранних стадиях развития переднего мозга человека при гистологическом исследовании четко отделить СП от ИЗ невозможно, поэтому в нашем исследовании СП определена как зона «деконденсации» нижнего слоя КП согласно Г.И. Полякову [2]. Первые признаки появления СП на гистологических препаратах выявлены в начале 11-й недели после оплодотворения в виде разрежения клеток КП в вентралатеральной области. В дорсолатеральной части стенки СП обнаружена на 12-й неделе после оплодотворения, а в дорсомедиальной начиная только с 13–14-й. Согласно I. Kostović et al. [14], на ранних стадиях (8–12,5 недели после оплодотворения) СП следует определять как преиспластинку. По этим данным, в латеральном неокортексе СП демонстрирует изменения в ламинарной организации на протяжении всего внутриутробного развития плода: СП представляет собой монослой в ранний период внутриутробного развития, затем она претерпевает трансформацию в двухслойную структуру между 13-й и 15-й неделями [17]. Тем не менее S.L. Ding et al. [18] не обнаружили никаких свидетельств существования подслоев СП на сроке 17 недель после оплодотворения. С помощью только гистологических методов в нашем исследовании разделение СП на два подслоя было обнаружено на 13-й неделе после оплодотворения.

Морфометрический анализ. Прямое измерение стенки полушария и ширины каждого из его компонентов может привести к большим различиям в значениях из-за индивидуальных различий и разницы в обработке гистологическими методами [19]. Однако полученные нами данные по абсолютным значениям ТЗ хорошо согласуются с другими данными литературы. В частности, данные о ширине стенок полушарий, ВЗ и КП у плодов 60 мм (начало 11-й недели после оплодотворения) согласуются с измерениями W. His [1]. Принимая во внимание различия в возрасте и размерах эмбрионов и плодов, полученные данные у плодов на 8-й и 15-й неделе после оплодотворения также согласуются с этим исследованием. Однако у плода на 13-й неделе после оплодотворения абсолютные значения измеренных структур сильно отклоняются, что, как предполагается, связано с различными протоколами обработки или индивидуальной вариативностью, поскольку общая

картина распределения ТЗ соответствовала характеристике для этого возраста согласно данным литературы (рис. 1 В, С). Следовательно, изучение относительных параметров становится особенно важным.

Согласно полученным результатам, на 3–4-м месяце внутриутробного развития человека наблюдается последовательное возрастание количества ТЗ, сопровождающееся увеличением ширины стенок полушарий и КП, в то время как ширина ВЗ уменьшается. Данные об увеличении ширины стенки полушария с возрастом плодов в целом совпадают с результатами работы M. Terashima et al. [15] о трехкратном увеличении относительной толщины КП от 21-й стадии Карнеги до 12-й недели после оплодотворения.

В результате нашего исследования было показано, что формирование ТЗ новой коры на 3–4-м месяце развития имеет значительные региональные гетерохронии, представляющие собой различия в скорости формирования дорсолатеральной и дорсомедиальной частей. Формирование дорсомедиальной части значительно задерживается по сравнению с дорсолатеральной. На это было указано еще в работе Г.И. Полякова (радиальный принцип в раннем развитии коры), но, к сожалению, он не проводил никаких специальных морфометрических измерений [2]. В работе M. Terashima et al. [15] также не проводилось региональных исследований формирования коры головного мозга. До настоящего времени региональные гетерохронии в формировании ТЗ не были количественно описаны.

В целом, ширина КП в течение 8–15-й недель после оплодотворения постепенно увеличивается, однако отношение ширины КП к ширине всей стенки уменьшается, так как общая ширина стенки увеличивается более быстрыми темпами. Ширина ВЗ отображает интенсивность клеточной пролиферации. Считается, что ширина ВЗ во время пренатального развития увеличивается с пиком примерно на 23-й неделе после оплодотворения, а затем уменьшается до эпендимального слоя толщиной всего в одну клетку [4, 14]. Относительный объем пролиферативных зон (ВЗ и СВЗ) заметно уменьшается с 13-й до 25-й недели после оплодотворения, когда интенсивность пролиферации резко снижается. В нашем исследовании показано, что уменьшение толщины ВЗ в дорсомедиальной и дорсолатеральной частях стенки переднего мозга начинается на очень ранних сроках развития. Ширина ВЗ по отношению к ширине всей стенки мозга и ширине КП постепенно уменьшается. Эти процессы более выражены в дорсолатеральной стенке полушарий. Таким образом, в течение 8–15-й недель после оплодотворения основной рост стенки полушария происходит в этой области не за счет увеличения ВЗ и КП, а за счет других зон – СВЗ, ИЗ и СП.

Знание нормальной хронологии формирования ТЗ может способствовать более ранней и точной диагностике аномалий развития головного мозга, что требует сопоставления гистологического строения с результатами неинвазивной визуализации мозга пло-

да [4, 9, 14, 18]. Однако исследования эмбрионального и плодного мозга человека на уровне микроморфологии крайне редки из-за особенностей материала. Таким образом, изучение коллекций по пренатальному развитию человека становится особенно значимым [20]. Результаты нашего исследования подтверждают, что срезы мозга из коллекции Института морфологии человека могут быть использованы для морфометрических исследований развития мозга.

Заключение

Во время формирования стенки переднего мозга человека в период с 8-й по 15-ю неделю после оплодотворения наблюдается последовательное увеличение числа транзиторных (временных) зон. Были выявлены гетерохронии в скорости развития дорсомедиальной и дорсолатеральной стенок переднего мозга, что может быть одной из причин будущей дифференциации полей неокортекса и требует углубленного изучения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Савельев, А.Е. Прошина, А.С. Харламова, Ю.С. Кривова, О.С. Годовалова. Сбор и обработка материала – С.В. Савельев, А.С. Харламова, О.С. Годовалова, Ю.С. Кривова. Анализ данных – А.Е. Прошина, А.С. Харламова, О.С. Годовалова. Написание текста – А.Е. Прошина, Ю.С. Кривова. Редактирование – А.С. Харламова, О.С. Годовалова, С.В. Савельев.

Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Saveliyev, A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova, Yu.S. Krivova, O.S. Godovalova. Collected the data – S.V. Saveliyev, A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova, Yu.S. Krivova. Performed the analysis – A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova. Wrote the paper – A.E. Proshchina, Yu.S. Krivova. Edited the manuscript – A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova, S.V. Saveliyev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Благодарность. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории развития нервной системы, которые участвовали в создании коллекции.

Acknowledgments. The authors would like to acknowledge all the other employees of the laboratory of nervous system development who participated in the creation of the collection.

Литература/References

1. *His W.* Die entwicklung des menschlichen Gehirns wahrend der ersten Monate. Leipzig: Verlag von S. Hirzel, 1904. 176 p. (In Germ.) Available from: <https://archive.org/details/dieentwicklung00hisw> (accessed 27.11.2023).
2. *Поляков Г.И.* Ранний и средний онтогенез коры большого мозга человека / Под ред. С.А. Саркисова, И.Н. Филимонова. Москва: Государственный институт мозга, 1937. 67 с. *Polyakov GI.* Early and middle ontogenesis of the human cerebral cortex / Ed by SA Sarkisov, IN Filimonov. Moscow: State Institute of The Brain, 1937. 67 p. (In Russ.).
3. *Bystron I, Blakemore C, Rakic P.* Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(2):110–22. DOI: 10.1038/nrn2252.
4. *Vasung L, Lepage C, Radoš M, Pletikos M, Goldman JS, Richiardi J et al.* Quantitative and qualitative analysis of transient fetal compartments during prenatal human brain development. *Front Neuroanat.* 2016;10:11. DOI: 10.3389/fnana.2016.00011.
5. *Kostović I.* The enigmatic fetal subplate compartment forms an early tangential cortical nexus and provides the framework for construction of cortical connectivity. *Prog Neurobiol.* 2020;194:101883. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101883.
6. The Boulder Committee. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat Rec.* 1970;166(2):257–61. DOI: 10.1002/ar.1091660214.
7. Federative International Committee on Anatomical Terminology (FICAT). *Terminologia Embryologica: International Embryological Terminology.* Stuttgart: Thieme Verlag, 2013. 312 p. DOI: 10.1055/b-0034-99435.
8. Federative International Programme for Anatomical Terminology (FIPAT). *Terminologia Embryologica.* 2nd ed. 2017. Available from: <https://fipat.library.dal.ca/te2>. (accessed 27.11.2023).
9. *Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF et al.* New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat.* 2019;235(3):432–51. DOI: 10.1111/joa.13055.
10. *Proshchina A, Kharlamova A, Krivova Y, Godovalova O, Otyga D, Gulimova V et al.* Neuromorphological Atlas of Human Prenatal Brain Development: white paper. *Life (Basel).* 2023;13(5):1182. DOI: 10.3390/life13051182.
11. *Hill MA.* Early human development. *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50(1):2–9. DOI: 10.1097/GRF.0b013e31802f119d.
12. *Gilbert-Barness E, Spicer DE, Steffensen TS.* Pediatric autopsy: fetus, newborn, and child. In: E Gilbert-Barness, DE Spicer, TS Steffensen (eds.). *Handbook of pediatric autopsy pathology.* 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2014. P. 7–83. DOI: 10.1007/978-1-4614-6711-3_2.
13. *Filimonoff IN.* A rational subdivision of the cerebral cortex. *Arch Neurol Psychiatry.* 1947;58(3):296–311. DOI: 10.1001/archneurpsyc.1947.02300320047002.
14. *Kostović I, Sedmak G, Judaš M.* Neural histology and neurogenesis of the human fetal and infant brain. *Neuroimage.* 2019;188:743–73. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.12.043.
15. *Terashima M, Ishikawa A, Männer J, Yamada S, Takakuwa T.* Early development of the cortical layers in the human brain. *J Anat.* 2021;239(5):1039–49. DOI: 10.1111/joa.13488.
16. *Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N.* The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron.* 2016;89(2):248–68. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.12.008.
17. *Duque A, Krsnik Z, Kostović I, Rakic P.* Secondary expansion of the transient subplate zone in the developing cerebrum of human and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(35):9892–7. DOI: 10.1073/pnas.1610078113.
18. *Ding SL, Royall JJ, Lesnar P, Facer BAC, Smith KA, Wei Y et al.* Cellular resolution anatomical and molecular atlases for prenatal human brains. *J Comp Neurol.* 2022;530(1):6–503. DOI: 10.1002/cne.25243.

19. *Kretschmann HJ, Schleicher A, Grottschreiber JF, Kullmann W.* The Yakovlev Collection. A pilot study of its suitability for the morphometric documentation of the human brain. *J Neurol Sci.* 1979;43(1):111–26. DOI: 10.1016/0022-510x(79)90076-5.
20. *Прощина А.Е., Харламова А.С., Кривова Ю.С., Савельев С.В.* Современные тенденции картирования головного мозга. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(1):15–23. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.15–23.
- Proshchina AE, Kharlamova AS, Krivova YuS, Saveliev SV.* Modern trends in brain mapping and atlasing. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):15–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.15–23.

Информация об авторах

Александра Евгеньевна Прощина – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Анастасия Сергеевна Харламова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Юлия Сергеевна Кривова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ольга Сергеевна Годовалова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Alexandra E. Proshchina – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-0515-8275>

Anastasia S. Kharlamova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-1163-4132>

Yuliya S. Krivova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-9692-3616>

Olga S. Godovalova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-9285-7241>

Sergey V. Saveliev – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

Морфофункциональные, молекулярные и иммунологические изменения в плаценте и периферической крови при патологическом прикреплении плаценты

И.А. Куликов¹, К.А. Артемьева², А.П. Алексанкин², Е.Р. Милютин¹,
И.И. Степанова², Н.В. Низяева², Л.М. Михалева²

¹ ГБУЗ МО Видновский перинатальный центр, Видное, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Врастанием плаценты называют аномальную инвазию ворсин трофобласта в миометрий. Врастание плаценты является одним из основных осложнений, приводящих к неблагоприятным исходам беременности. Целью работы была характеристика морфофункциональных, молекулярных и иммунных изменений в плаценте и периферической крови при различных типах врастания плаценты.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие беременные (n=45), у которых по данным УЗИ было выявлено приращение (placenta accreta) (n=15) или врастание (placenta increta) (n=15) плаценты в стенку матки, и женщины группы сравнения без врастания плаценты (n=15) с рубцом на матке после перенесенного кесарева сечения, на сроке гестации 35–38 недель.

Выполняли патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование плаценты с использованием мышинных моноклональных антител к плацентарному α_1 -микроглобулину, трофобластическому $\beta 1$ -гликопротеину, плацентарному лактогену, протеиназе 3 и фактору некроза опухоли α . Оценку уровня плацентарного лактогена, трофобластического $\beta 1$ -гликопротеина, плацентарного α_1 -микроглобулина и протеиназы 3 в сыворотке крови проводили методом количественного иммуноферментного анализа. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом многоцветной проточной цитометрии.

Результаты. Установлено, что врастание плаценты сопровождается достоверным увеличением экспрессии всех исследуемых нами маркеров в ней по сравнению с экспрессией в группе с рубцом на матке без врастания. Максимальная экспрессия плацентарного α_1 -микроглобулина выявлена в группе placenta increta. В сыворотке крови пациенток с врастанием плаценты обнаружено значимое увеличение концентрации протеиназы 3, снижение уровня плацентарного α_1 -микроглобулина, а также увеличение содержания лактогена в группе placenta increta.

Заключение. При патологическом прикреплении плаценты в ее ворсинах отмечается функциональная избыточность плацентарных белков, а также локальное и системное усиление провоспалительного статуса. Нарушение баланса между плацентарными факторами защиты и агрессии, вероятно, будет являться предпосылкой к развитию патологической инвазии ворсин плаценты.

Ключевые слова: врастание плаценты, иммунный статус, плацентарные белки, протеиназа 3

Для корреспонденции: Наталья Викторовна Низяева. E-mail: niziaeva@gmail.com

Для цитирования: Куликов И.А., Артемьева К.А., Алексанкин А.П., Милютин Е.Р., Степанова И.И., Низяева Н.В., Михалева Л.М. Морфофункциональные, молекулярные и иммунологические изменения в плаценте и периферической крови при патологическом прикреплении плаценты. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):42–52. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.42-52.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (№ 123030700104-3).

Статья поступила 15.05.2024. Получена после рецензирования 06.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Placental and peripheral blood changes in functional morphology and immunology in patients with placenta accreta spectrum

I.A. Kulikov¹, K.A. Artemyeva², A.P. Aleksankin², E.R. Milyutina¹,
I.I. Stepanova², N.V. Nizyaeva², L.M. Mikhaleva²

¹ Vidnoye Perinatal Center, Vidnoye, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Placenta accreta spectrum is an abnormal invasion of villous trophoblast into the myometrium and one of the most severe complications of pregnancy. We aimed to study morphofunctional, molecular, and immunological changes in the placenta and peripheral blood in various types of placenta accreta spectrum. *Materials and methods.* The study involved 45 pregnant women who underwent ultrasound examination at weeks 35–38. According to the ultrasound data, 15 women had placenta accreta and 15 women developed placenta increta. The comparison group included 15 pregnant women without placenta accreta spectrum with a uterine scar after cesarean section. Histological and immunohistochemical studies were performed on paraffin sections of the placentas. We used mouse antibodies to insulin-like growth factor-binding protein-1, pregnancy-specific β -1 glycoprotein, and human placental lactogen, proteinase 3 and measured them using ELISA. We also studied tumor necrosis factor. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was performed using flow cytometry.

Results. Placenta accreta spectrum is accompanied by increased intensity of IHC staining of placental villi for all the studied markers, in contrast to those in the comparison group. The maximum intensity of insulin-like growth factor-binding protein-1 staining was found in placenta increta. Increased serum concentration of proteinase 3 and placental lactogen (placenta increta) and decreased level of insulin-like growth factor-binding protein-1 were found in placenta accreta spectrum.

Conclusion. In placenta accreta spectrum, there is a functional redundancy of placental proteins and an increased pro-inflammatory status. An imbalance between aggressive factors are likely to contribute to pathological villous invasion.

Keywords: placenta accreta spectrum, immune status, placental proteins, proteinase 3

For correspondence: Natalia V. Nizyaeva. E-mail: nizyaeva@gmail.com

For citation: Kulikov I.A., Artemyeva K.A., Aleksankin A.P., Milyutina E.R., Stepanova I.I., Nizyaeva N.V., Mikhaleva L.M. Placental and peripheral blood changes in functional morphology and immunology in patients with placenta accreta spectrum. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):42–52 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.42-52.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery” (No. 123030700104-3).

Received 15.05.2024. **Received in revised form** 06.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Патологическим прикреплением (приращением, вращением, прорастанием) плаценты (placenta accreta spectrum, PAS) называют аномальную инвазию ворсин трофобласта в миометрий. PAS является одним из основных осложнений, приводящих к серьезным неблагоприятным исходам беременности и в ряде случаев к материнской смертности. Ведущим фактором риска развития PAS служит повреждение децидуальной оболочки, в основном связанное с предшествовавшим кесаревым сечением (КС). Выделяют три гистологических подтипа нарушения инвазии ворсин хориона: приращение к миометрию – placenta accreta, прорастание мышечной оболочки – placenta increta, прорастание стенки матки с вовлечением соседних органов – placenta percreta. Наиболее часто встречаются первые два подтипа PAS [1].

Из-за связи PAS с острыми и хроническими гипоксическими поражениями плаценты [2], повышени-

ем количества клеток вневорсинчатого трофобласта (ВВТ) в хорионическом диске PAS следует рассматривать как нарушение имплантации плаценты и инвазии трофобласта, а не только как децидуальный дефицит вследствие повреждения матки [3]. Инвазивный трофобласт выполняет множество важных функций, необходимых для фетоплацентарного развития, включая прикрепление плаценты к матке, регулирование иммунной толерантности матери и преобразование материнских спиральных артерий, обеспечивающих адекватное кровоснабжение межворсинчатого пространства. Трофобластическая миграция и инвазия во время нормального развития плаценты должны находиться под ауто- или паракринным взаимовлиянием различных видов молекул, таких как факторы роста и их рецепторы, цитокины, гормоны, молекулы адгезии и ферменты. В то же время ряд биологических молекул, секретируемых плацентой, способствует фетоплацентарному взаимодействию и контролирует

функции как самой плаценты, так и отдаленных мишеней в материнском организме, адаптируя кровообращение матери, развитие молочных желез во время беременности и обеспечивая трофику плода [4]. Плацентарный лактоген (ПЛ) секретируется на протяжении всей беременности и способствует регуляции секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы. Нарушенная секреция ПЛ может привести к плацентарной дисфункции и нарушению роста и развития плода [5]. Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы [6]. Плацентарный α ₁-микроглобулин (ПАМГ, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGF)-1, IGFBP-1) принимает участие в имплантации и росте плода [7, 8]. Повреждение децидуальной оболочки способствует иммунному дисбалансу на границе матери и плода, что может вести к аномальной инвазии трофобласта и усилению васкуляризации плаценты [9].

Патогенез PAS до сих пор полностью не изучен, и данные об иммунной дисрегуляции при этой патологии отсутствуют. Физиологическое провоспалительное состояние, связанное с ранними сроками беременности, характеризуется активацией циркулирующих нейтрофилов и усиливается при осложненной PAS беременности [10, 11]. PAS опасно прежде всего массивным кровотечением, которое может привести к диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови, полиорганной недостаточности и смерти матери. Диагностика PAS в настоящее время проводится с помощью ультразвукового исследования с чувствительностью от 77 до 87% и специфичностью от 96 до 98% [12]. Тем не менее функциональное состояние самой плаценты сложно оценить с помощью инструментальных методов исследования. Необходим поиск маркеров, отражающих патогенез PAS, с целью улучшения антенатальной диагностики и возможной профилактики этого грозного заболевания. Цель работы – оценить морфофункциональные, молекулярные и иммунные изменения в плаценте и периферической крови при различных типах врастания плаценты.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие беременные, у которых при проведении УЗИ было поставлено заключение о наличии приращения (pl. accreta) (n=15) или врастания (pl. increta) (n=15) плаценты в стенку матки, согласно клиническим рекомендациям [1, 13], и женщины группы сравнения с рубцом на матке после перенесенного КС, без врастания плаценты (n=15) со сроками гестации 35–38 недель.

Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 231 от 28.08.2023).

Критерии включения в группу pl. accreta / pl. increta

1. Одноплодная беременность.
2. Возраст беременной от 18 до 40 лет.
3. Наличие УЗ-критериев pl. accreta / pl. increta, подтвержденный патоморфологический диагноз после родоразрешения.
4. Родоразрешение путем операции кесарева сечения.

Критерии включения в группу сравнения

1. Физиологическая беременность, наступившая в естественном цикле, после предшествующего КС.
2. Оперативное родоразрешение по акушерским показаниям.

Патоморфологическое исследование

Фрагменты ткани плаценты пациенток были взяты из краевой, парацентральной, центральной зон плацентарного диска и зоны приращения/врастания в стенку матки. Полученные фрагменты размерами 1,5×1,5×1 см фиксировали в 10% растворе формалина, pH 7,4 («Биовитрум», Россия), в течение 24 часов, затем заливали в парафин. Далее из них изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Исследовали не менее 10 фрагментов.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли на парафиновых срезах плаценты. В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела (МАТ) к ПАМГ, ТБГ, ПЛ, Пр3, полученные в лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», как описано Н.А. Старосветской с соавт. [14], и ФНО α (1:100; ab220210, Abcam, Великобритания). Применяли систему детекции PrimeVision (ООО «ПраймБиоМед», Россия). По окончании инкубации срезы докрасивали гематоксилином Майера.

Интенсивность ИГХ окрашивания оценивали в единицах оптической плотности с применением светового микроскопа Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия) с цифровой фотокамерой при помощи программы ImageScoreM (Leica Microsystems, Германия) при \times 400 с анализом 20 полей зрения в каждом препарате, выделяя позитивно окрашенную зону и вычитая оптическую плотность фона пустого стекла и отрицательного контроля.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА для ПЛ, ТБГ и ПАМГ человека проводили согласно инструкциям производителя (ООО «Диатех-ЭМ», Россия). Концентрацию Пр3 выявляли в двухцентровом ИФА на 96-луночных полистирольных планшетах (Maxibinding, SPL Life Sciences, Республика Корея) с использованием мышинных МАТ (PR49, сорбированные в лунки планшета, PR45 в качестве конъюгата с пероксидазой хрена), полученных в лаборатории патоло-

гии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Использовалась цельная кровь из локтевой вены в объеме 2,7 мл, которую собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей ЭДТА в концентрации 1,6 мг/мл.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение процентного и абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+), естественных киллерных клеток (ЕКК) (CD56+) и В-клеток (CD19+), проводили методом многоцветной проточной цитометрии на анализаторе FC500 (Beckman Coulter, США). Использовались готовые коммерческие наборы мышиных МАТ: CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США) и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США). Для подсчета абсолютного количества Т-, В-лимфоцитов и ЕКК использовали набор реагентов для прямого определения лимфоцитов Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter, США). Подготовку лейкоцитов цельной крови к проточному цитометрическому исследованию проводили лизированием эритроцитов и фиксацией проб цельной крови с использованием набора реагентов IO TEST3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США). Для ежедневной проверки оптической системы и струйной автоматической проточного цитометра применяли Flow-Check™ Fluorospheres (Beckman Coulter, США).

Для каждой пациентки использовали две полипропиленовые пробирки Coulter (12×75 мм, Beckman Coulter, США). К 50 мкл (1×10^6 клеток) образцов крови добавляли 5 мкл меченых моноклональных антител и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 минут. После инкубации лизировали эритроциты 1х IO TEST3 Lysing Solution в течение 15 минут в темноте. В полученную суспензию лимфоцитов вносили 50 мкл Flow-Count™ Fluorospheres и проводили оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов на анализаторе FC500. Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью проприетарного программного обеспечения: The jamovi project version 2.5 (Австралия, 2024). Нормальность распределения выборочных данных осуществляли согласно критерию Шапиро–Уилка. В связи с тем, что в большинстве групп данных распределение отличалось от нормального, результаты представляли в виде медианы и квартилей – Ме (Q25%; Q75%). Для оценки достоверности различий среди трех групп наблюдений использовали метод непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Апостериорные попарные сравнения осуществляли по методу Двасса–Стила–

Кричлоу–Флигнера (Dwass–Steel–Critchlow–Fligner, DSCF) с включенной поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Различия считали значимыми при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ отмечали тенденцию к значимости различий.

Результаты

В группе женщин с наличием приращения и вращающейся плаценты ворсинчатое дерево было в состоянии компенсации и соответствовало сроку гестации, значимые отличия в строении ворсинчатого дерева и соотношения типов ворсин не отмечены. Преобладали хорошо капилляризированные зрелые промежуточные ворсины, терминальные ворсины от единичных до 10–20% в зависимости от срока гестации. В группе PAS в области инвазии ворсин децидуальные клетки отсутствовали (рис. 1 А–С).

В результате исследования установлено, что в образцах плаценты от женщин с pl. accreta отмечалось достоверное повышение интенсивности ИГХ реакции с антителами к ТБГ, Пр3, ФНОα, ПАМГ и ПЛ, а в группе женщин с беременностью, осложненной pl. increta, наблюдали усиление ИГХ реакции на ФНОα, Пр3 и ПАМГ, а также тенденцию к ее усилению для ТБГ и ПЛ (рис. 2 А–О, табл. 1).

Интенсивность реакции на ПАМГ имела достоверные различия в группах с патологическим прикреплением плаценты и в контрольной группе с максимальной экспрессией в группе pl. increta, однако децидуальные клетки располагались неравномерно, присутствовали дистрофические изменения децидуальной оболочки, замещение ее депозитами фибриноида. Ввиду этого локальное повышение интенсивности реакции с антителами к ПАМГ, вероятно, носит компенсаторный характер.

В сыворотке крови беременных с диагнозом «патологическое прикрепление плаценты» обнаружили значимое повышение уровня Пр3 и снижение ПАМГ в обеих группах, снижение уровня ТБГ в группе pl. increta, тенденцию к увеличению содержания ПЛ в группе pl. accreta, а также значимое увеличение его уровня в группе pl. increta относительно группы несложненной беременности (табл. 2).

Методом проточной цитометрии определяли субпопуляции лимфоцитов периферической крови. При PAS в обеих группах выявили увеличение общего количества лимфоцитов, а также количества всех Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+) и В-клеток (CD3–CD19+). В группе pl. accreta было увеличено количество Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) и ЕКК (CD56+). Для оценки иммунорегуляторного баланса Т-клеток рассчитывали соотношение между хелперными (CD4+) и цитотоксическими (CD8+) Т-клетками. Выявили статистически значимое увеличение отношения Т-хелперов к Т-цитотоксическим клеткам в группе pl. accreta и тенденцию к его увеличению в группе pl. increta (табл. 3).

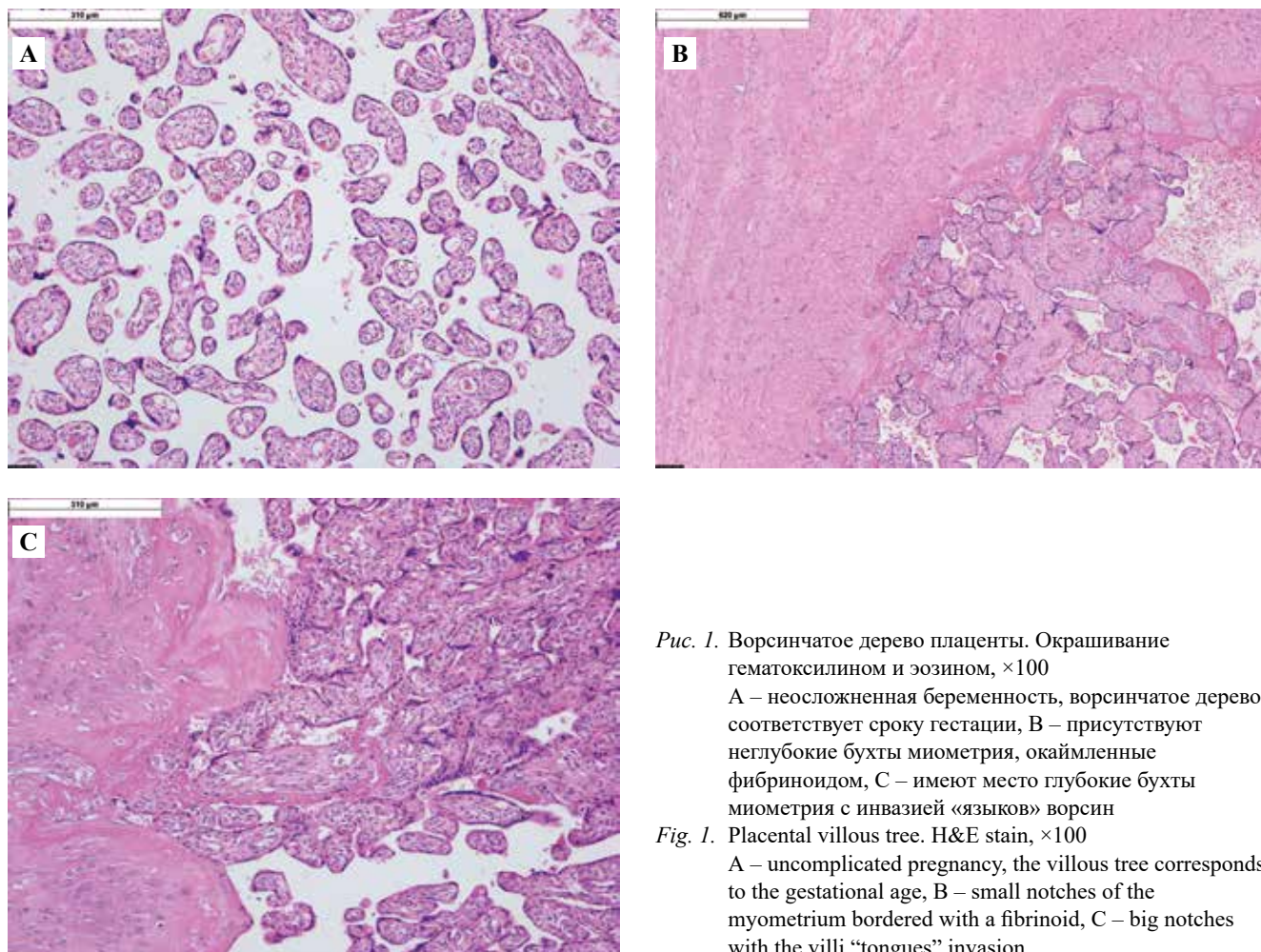


Рис. 1. Ворсинчатое дерево плаценты. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$

А – неосложненная беременность, ворсинчатое дерево соответствует сроку гестации, В – присутствуют неглубокие бухты миометрия, окаймленные фибриноидом, С – имеют место глубокие бухты миометрия с инвазией «язычков» ворсин

Fig. 1. Placental villous tree. H&E stain, $\times 100$

A – uncomplicated pregnancy, the villous tree corresponds to the gestational age, B – small notches of the myometrium bordered with a fibrinoid, C – big notches with the villi “tongues” invasion

Таблица 1 | Table 1

**Интенсивность ИГХ реакции на исследуемые маркеры в плаценте, ЕОП* |
Immunohistochemical expression of the tested markers in the placenta, ODU***

Группы Groups	ТБГ TBG	Пр3 PR3	ПАМГ IGFBP-1	ПЛ HPL	ФНО α TNF
Рубец на матке Scar on the uterus 1	54,96 (32,40; 84,00)	33,64 (29,83; 37,50)	61,48 (54,00; 64,00)	64,30 (58,18; 77,53)	29,40 (21,00; 35,04)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	72,24 (62,00; 79,00)	68,50 (52,70; 73,23)	85,28 (63,93; 94,47)	78,87 (73,00; 82,00)	35,46 (29,50; 41,42)
Врастание плаценты Placenta increta 3	64,28 (52,89; 72,93)	70,06 (63,83; 73,23)	99,61 (90,43; 107,70)	73,59 (65,29; 81,53)	36,81 (25,95; 42,00)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}=0,039$ $p_{1-3}=0,057$ $p_{2-3}=0,073$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,938$	$p_{1-2}=0,0002$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,001$	$p_{1-2}=0,019$ $p_{1-3}=0,055$ $p_{2-3}=0,057$	$p_{1-2}=0,017$ $p_{1-3}=0,022$ $p_{2-3}=0,98$

*ЕОП – единицы оптической плотности | ODU – optical density units

Таблица 2 | Table 2

Уровень плацентарных белков и протеиназы 3 в плазме крови | Serum levels of placental proteins and proteinase 3

Группы Groups	Пр3, нг/мл PR3, ng/ml	ТБГ, мкг/мл TBG, mkg/ml	ПАМГ, нг/мл IGFBP-1, ng/ml	ПЛ, мг/л HPL, mg/l
Рубец на матке Scar on the uterus 1	7,14 (5,03; 8,25)	237,15 (144,10; 349,20)	33,35 (26,65; 59,4)	10 (7,2; 12)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	13,1 (9,18; 16,43)	310,4 (164,20; 345,48)	15,25 (7,15; 21,53)	13 (5,9; 16,4)
Врастание плаценты Placenta increta 3	15,6 (9,65; 31,5)	202,6 (139,60; 244,08)	24,1 (16,9; 31,98)	18 (14,25; 19,75)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}=0,013$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,022$	$p_{1-2}=0,144$ $p_{1-3}=0,22$ $p_{2-3}<0,001$	$p_{1-2}=0,012$ $p_{1-3}=0,017$ $p_{2-3}=0,22$	$p_{1-2}=0,09$ $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,18$

Таблица 3 | Table 3

Иммунофенотипирование клеток | Immunophenotyping

Группы Groups	Общее количество лимфоцитов ($\times 10^9/л$) Total number of T cells ($\times 10^9/l$)	(CD3+) Т-клетки, ($\times 10^9/л$) T cell, ($\times 10^9/l$)	(CD3+CD4+) Т-хелперы, ($\times 10^9/л$) T-helpers ($\times 10^9/l$)	(CD3+CD8+) Т-цитотоксические клетки, ($\times 10^9/л$) T-killers ($\times 10^9/l$)	Т-хелперы / Т-киллеры T-helpers / T-killers	В-клетки, ($\times 10^9/л$) B-cells (CD3-CD19+, ($\times 10^9/l$))	(CD56+) ЕКК, ($\times 10^9/л$) NK-cells, ($\times 10^9/l$)
Рубец на матке Scar on the uterus 1	0,80 (0,71; 0,88)	0,6 (0,5; 0,7)	0,3 (0,2; 0,33)	0,2 (0,1; 0,21)	1,4 (1,2; 1,6)	0,07 (0,05; 0,1)	0,08 (0,04; 0,1)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	1,10 (1,03; 1,76)	0,9 (0,8; 1,5)	0,4 (0,35; 0,5)	0,3 (0,3; 0,55)	1,6 (1,33; 2,06)	0,1 (0,09; 0,15)	0,1 (0,1; 0,2)
Врастание плаценты Placenta increta 3	1,0 (1,07; 1,10)	0,80 (0,6; 0,93)	0,45 (0,35; 0,47)	0,2 (0,18; 0,28)	1,83 (1,0; 2,47)	0,09 (0,06; 0,2)	0,09 (0,07; 0,1)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,0022$ $p_{2-3}=0,59$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}=0,0004$ $p_{2-3}=0,59$	$p_{1-2}=0,0053$ $p_{1-3}=0,054$ $p_{2-3}=0,89$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}=0,062$ $p_{2-3}=0,01$	$p_{1-2}=0,02$ $p_{1-3}=0,061$ $p_{2-3}=0,92$	$p_{1-2}=0,047$ $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,970$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,427$ $p_{2-3}=0,03$

Обсуждение

Известно, что риск врастания плаценты ассоциирован с увеличением частоты диагностических выскабливаний, операций кесарева сечения с формированием неполноценного рубца [1], однако проведенное патоморфологическое исследование показало, что плацента не имела значимых патологических отличий и соответствовала сроку гестации.

Установлено, что PAS сопровождается достоверным снижением сывороточного содержания ПАМГ в сыровотке крови и тенденцией к увеличению содержания

ПЛ в группе pl. increta, а также большей интенсивностью реакции в ворсинках на ТБГ и ПЛ в сравнении с группой неосложненной беременности. Наши данные согласуются с результатами работ А. Kawashima et al. и J. Li et al., показавшими, что медиана мРНК ПЛ в материнской плазме на сроке от 28 до 32 недель беременности была выше у женщин с предлежанием плаценты и PAS по сравнению с нормальной беременностью [12, 15]. Предположительно во время формирования плаценты клетки ВВТ имеют решающее значение для прикрепления плаценты к стенке матки;

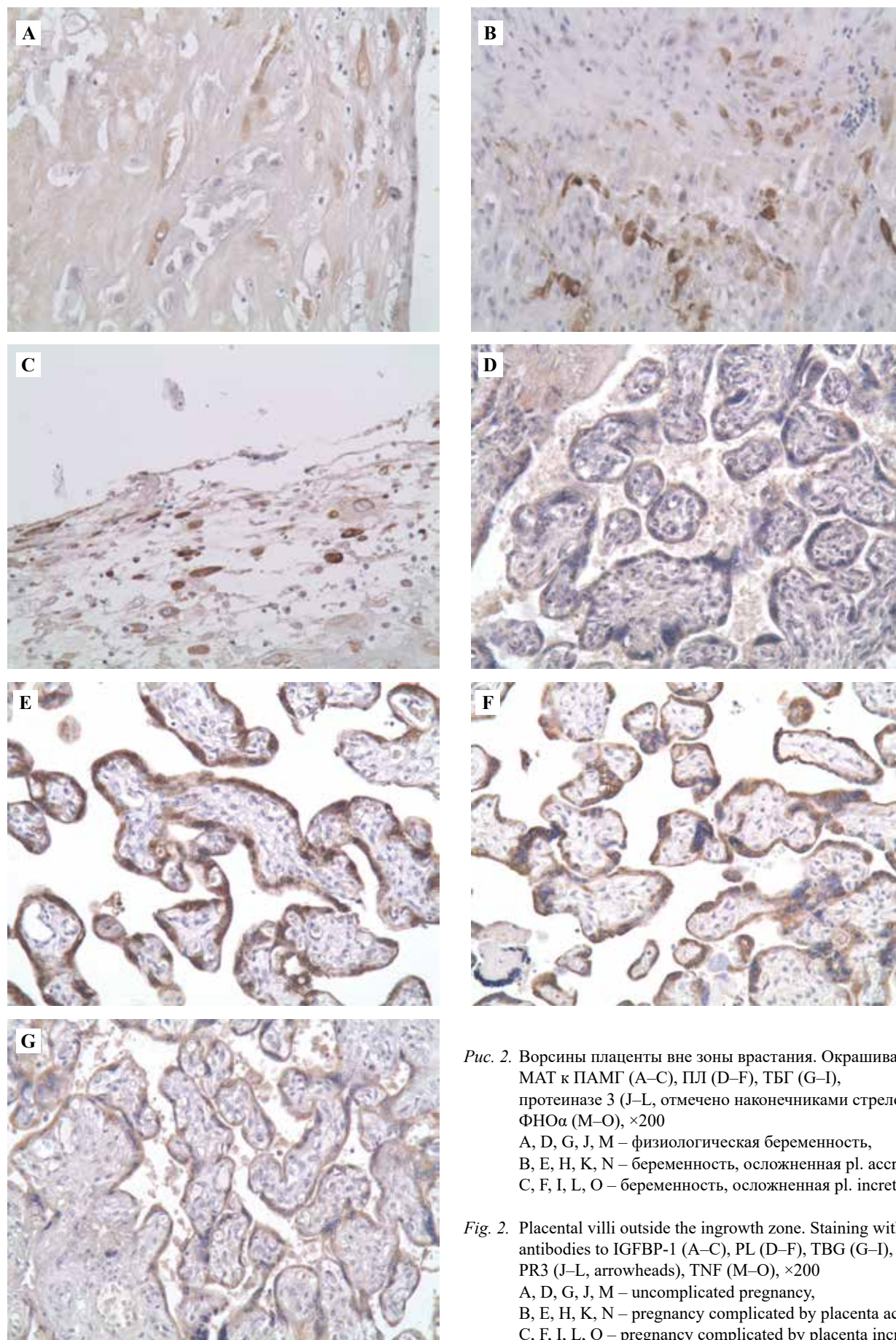
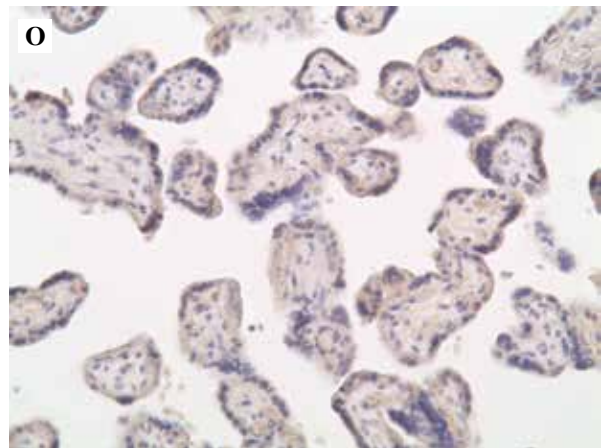
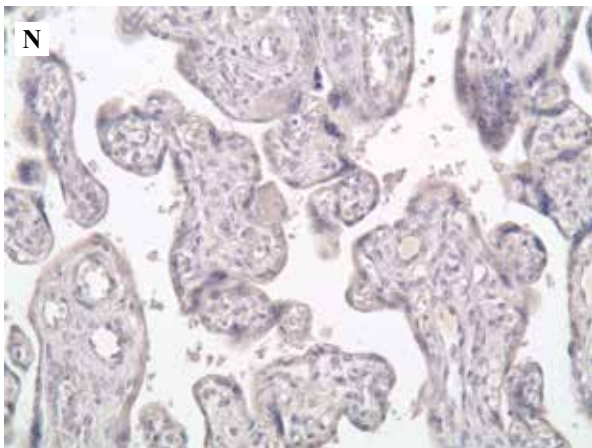
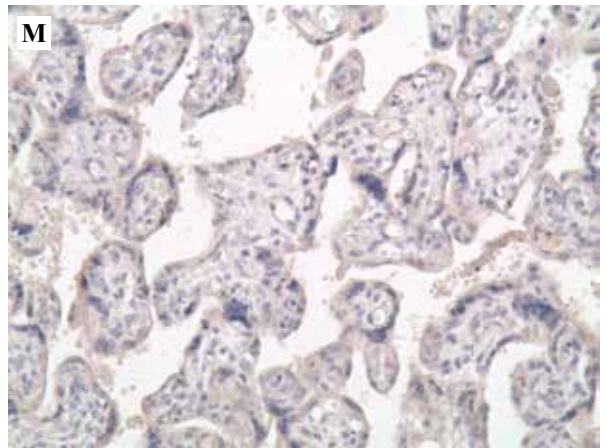
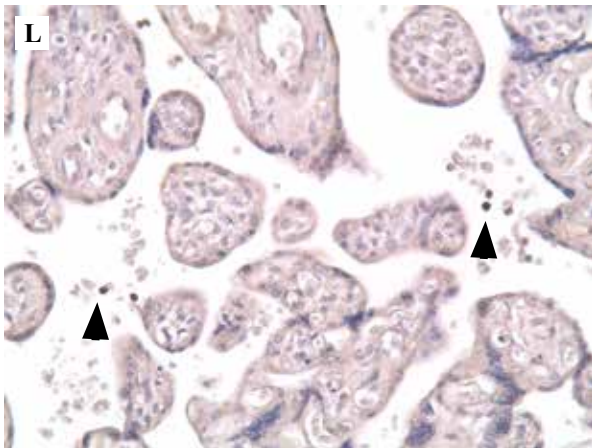
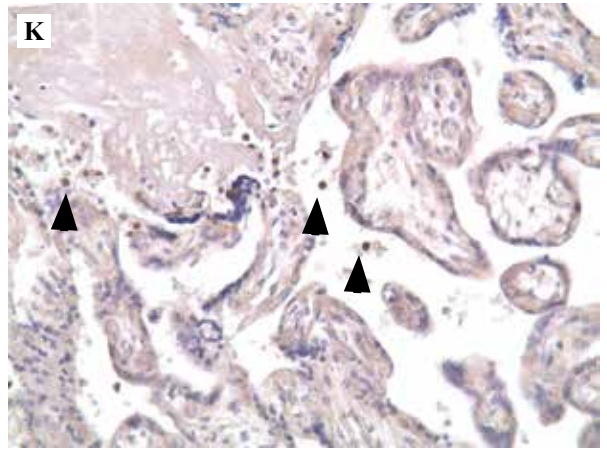
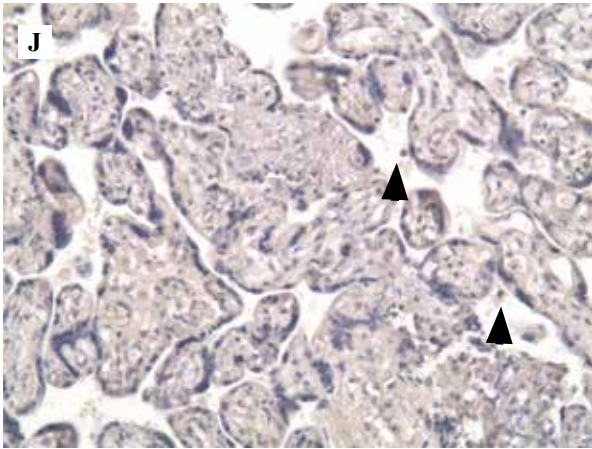
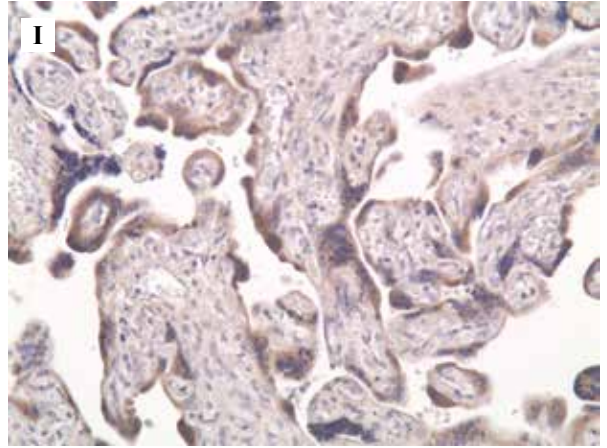
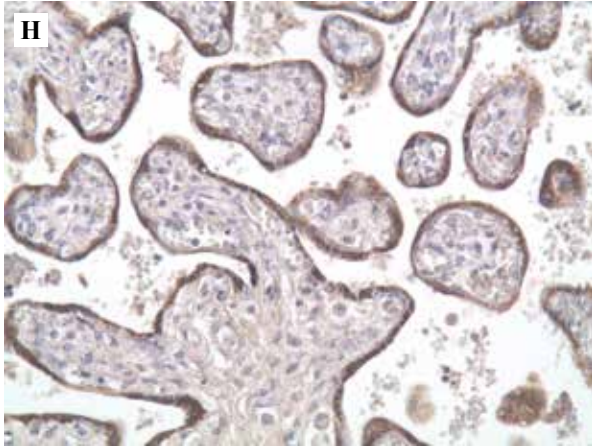


Рис. 2. Ворсины плаценты вне зоны врастания. Окрашивание МАТ к ПАМГ (А–С), ПЛ (D–F), ТБГ (G–I), протеиназе 3 (J–L, отмечено наконечниками стрелок), ФНО α (M–O), $\times 200$
 А, D, G, J, M – физиологическая беременность,
 В, E, H, K, N – беременность, осложненная pl. accreta,
 С, F, I, L, O – беременность, осложненная pl. increta

Fig. 2. Placental villi outside the ingrowth zone. Staining with antibodies to IGFBP-1 (A–C), PL (D–F), TBG (G–I), PR3 (J–L, arrowheads), TNF (M–O), $\times 200$
 A, D, G, J, M – uncomplicated pregnancy,
 B, E, H, K, N – pregnancy complicated by placenta accreta,
 C, F, I, L, O – pregnancy complicated by placenta increta



считается, что эти клетки продуцируют высокие уровни ПЛ. Вероятно, повышение уровня ПЛ у женщин с предлежанием плаценты или PAS может отражать патологическую активность этого процесса [12].

Усиление интенсивности реакции на ТБГ в ворсинах плаценты при PAS, возможно, носит компенсаторный, адаптивный характер. ТБГ известен как один из немногих биологических активаторов трансформирующего фактора роста (ТФР)- $\beta 2$ и, как предполагается, обладает противовоспалительными функциями [16]. В период беременности ТБГ участвует в становлении иммунной толерантности, стимулируя продукцию ИЛ-10 Т-регуляторными лимфоцитами с одновременным угнетением продукции ИЛ-17А Тх17-лимфоцитов [6]. Хотя в нашем исследовании отмечалась повышенная экспрессия ПАМГ в децидуальных клетках, само расположение их в децидуальной пластинке было неравномерным, децидуальная пластинка характеризовалась дистрофическими изменениями, замещением депозитами плодного фибриноида, поэтому, наиболее вероятно, локальное повышение экспрессии ПАМГ носило компенсаторный характер. В плазме крови уровень ПАМГ был снижен.

Известно, что ПАМГ стимулирует миграцию клеток ВВТ, по-видимому, путем связывания его домена Arg-Gly-Asp (RGD) с интегрином $\alpha 5 \beta 1$, что приводит к фосфорилированию киназы фокальной адгезии (ФАК) и MAPK (ERK-1 и ERK-2). Децидуальный ПАМГ может взаимодействовать с трофобластом, экспрессирующим IGF-II и секретирующим протеазу, для модулирования инвазии. Аутокринно-паракринное действие IGF-II может быть важно как для процесса инвазии, так и для нормального функционирования трофобласта и децидуальной оболочки [7, 8].

Мы выявили, что при PAS значимо увеличены как сывороточное содержание Пр3, так и интенсивность ИГХ на Пр3 и ФНО α в сравнении с группой физиологической беременности. Показано, что повышение уровня ФНО- α может способствовать миграции и инвазии клеток трофобласта. ФНО- α усиливает окислительный стресс и увеличивает количество TUNEL-положительных ядер, соотношение Вах/Vcl-2 и соотношение расщепленной каспазы-3/каспазы-3, одновременно снижая жизнеспособность клеток в первичной культуре трофобласта человека [17, 18]. Наряду с этим при гиперактивации нейтрофилы высвобождают в местах воспаления большое количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), включающих нити ДНК и сериновые протеазы, в том числе протеиназу 3. NET принимают участие в патогенезе различных заболеваний, связаны с нарушением свертывания крови, ассоциированы с тромботическими осложнениями, в том числе способствуют распространению метастазов [19]. Недавние исследования показали, что эти протеазы способны активировать провоспалительные цитокины, включая ИЛ-1 β и ФНО- α [20]. Таким образом, активация нейтрофилов при PAS формирует порочный

круг: воспаление–высвобождение NET–дальнейшая миграция и инвазия трофобласта.

В нашей работе выявлено увеличение абсолютного количества всех Т-клеток и Т-хелперов при PAS, включая увеличение Т-цитотоксических, В-клеток и ЕКК в группе pl. accreta. В процентном отношении было увеличено количество Т-клеток и уменьшено количество В-клеток (pl. accreta) и ЕКК (CD3–CD56+) (pl. increta) по сравнению с этими показателями в группе физиологической беременности. О. El-Badawy et al. и S. AbdelFattah et al. также показали в своих исследованиях, что случаи PAS связаны с низким уровнем ЕКК [21, 22]. Известно, что В-1b-лимфоциты вырабатывают антитела в ответ на идентификацию антигена, обеспечивая защиту от вторжения патогенов. С другой стороны, клетки В-1a секретируют естественные антитела IgM с низким средством, полиреактивностью и самореактивностью, независимо от антигенных стимулов. Эти естественные антитела помогают в клиренсе апоптотических клеток, влияя на иммунный ответ во время ремоделирования тканей [23, 24]. Возможно, уменьшение количества В-клеток, выявленное в нашем исследовании, свидетельствует о недостаточной функции либо истощении механизма «очистки» от поврежденных окружающих тканей и клеточного дебриса при вращении ворсин. Мы выявили статистически незначимое увеличение отношения Т-хелперов к Т-цитотоксическим клеткам. G. Makrydimas et al. показали, что увеличение этого соотношения наблюдалось у женщин с внематочной беременностью [25]. Очевидно, выявленные нами изменения несут как патологический характер, объясняющий усиление инвазии трофобласта на фоне снижения ПАМГ децидуальных клеток, так и компенсаторно-приспособительный, направленный на сохранение беременности и улучшение трофики развивающегося плода.

Заключение

Число исследований, результаты которых внесли вклад в понимание молекулярной биологии вращающейся плаценты, остается недостаточным. В результате нашей работы установлено, что вращение плаценты сопровождается усилением провоспалительного статуса, а также функциональной избыточностью плацентарных белков как в самой плаценте вне зоны вращающейся, так и в системном кровотоке. В настоящее время надежного сывороточного биомаркера вращающейся плаценты нет, однако данные, которые будут получены в исследованиях более крупных популяций, можно будет комбинировать с УЗ- и МРТ-визуализацией для антенатального скрининга вращающейся плаценты. Нарушение баланса между факторами защиты и агрессии (отсутствием децидуальных клеток, обладающих ограничивающими свойствами, и наличием трофобласта с сохраненными инвазивными особенностями), является важной предпосылкой к развитию патологической инвазии ворсин плаценты. Для полного понимания этих процессов необходимы дальнейшие исследования.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Низяева.
Сбор и обработка материала – И.А. Куликов, Е.Р. Милютин, И.И. Степанова, А.П. Алексанкин, К.А. Артемьева.
Написание текста – К.А. Артемьева, Н.В. Низяева.
Редактирование – Н.В. Низяева, Л.М. Михалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Nizyaeva.
Collected the data and performed the analysis – I.A. Kulikov,
E.R. Milyutina, I.I. Stepanova, A.P. Aleksankin, K.A. Artemyeva.
Wrote the paper – K.A. Artemyeva, N.V. Nizyaeva.
Edited the manuscript – N.V. Nizyaeva, L.M. Mikhaleva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Jauniaux E, Ayres-de-Campos D, Langhoff-Roos J, Fox KA, Collins S. FIGO classification for the clinical diagnosis of placenta accreta spectrum disorders. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019;146(1):20–4. DOI: 10.1002/ijgo.12761.
2. Куликов И.А., Низяева Н.В., Сухачева Т.В., Серов Р.А., Тихонова Н.Б., Фокина Т.В. и др. Сравнительная морфологическая характеристика маточно-плацентарной области при аномальном прикреплении плаценты. *Acta Biomedica Scientifica.* 2023;8(4):68–79. DOI: 10.29413/ABS.2023-8.4.8. Kulikov IA, Nizyaeva NV, Sukhacheva TV, Serov RA, Tikhonova NB, Fokina TV et al. Comparative morphological characteristics of the uteroplacental area in abnormal placentation. *Acta Biomedica Scientifica.* 2023;8(4):68–79 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2023-8.4.8.
3. Stanek J. Placenta accreta: a spectrum of lesions associated with shallow placental implantation. *Obstet Gynecol Int.* 2020;2020:4230451. DOI: 10.1155/2020/4230451.
4. Rattila S, Kleefeldt F, Ballesteros A, Beltrame JS, Ribeiro M, Ergün S et al. Pro-angiogenic effects of pregnancy-specific glycoproteins in endothelial and extravillous trophoblast cells. *Reproduction.* 2020;160(5):737–50. DOI: 10.1530/REP-20-0169.
5. Sibiak R, Jankowski M, Gutaj P, Mozdziak P, Kempisty B, Wender-Ożegowska E. Placental lactogen as a marker of maternal obesity, diabetes, and fetal growth abnormalities: current knowledge and clinical perspectives. *J Clin Med.* 2020;9(4):1142. DOI: 10.3390/jcm9041142.
6. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Раев М.Б., Храмов П.В., Заморина С.А. Иммунорегуляторный потенциал трофобластического β 1-гликопротеина. *Медицинская иммунология.* 2021;23(3):455–468. DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2170. Timganova VP, Bochkova MS, Rayev MB, Khramtsov PV, Zamorina SA. Immunoregulatory potential of pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Medical Immunology (Russia).* 2021;23(3):455–468 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2170.
7. Lala PK, Nandi P. Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: the role of decorin. *Cell Adh Migr.* 2016;10(1-2):111–25. DOI: 10.1080/19336918.2015.1106669.
8. Lai W, Yu L. Insulin-like growth factor 1 ameliorates preeclampsia by inhibiting zinc finger E-box binding homeobox 1 by up-regulation of microRNA-183. *J Cell Mol Med.* 2023;27(9):1179–91. DOI: 10.1111/jcmm.17403.
9. Goh WA, Zalud I. Placenta accreta: diagnosis, management and the molecular biology of the morbidly adherent placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(11):1795–800. DOI: 10.3109/14767058.2015.1064103.
10. Bouvier S, Fortier M, Vincent L, Demattei C, Mousty E, Herzog M et al. NETosis markers in pregnancy: effects differ according to histone subtypes. *Thromb Haemost.* 2021;121(7):877–90. DOI: 10.1055/s-0040-1722225.
11. Zhou J, Chen H, Xu X, Liu Y, Chen S, Yang S et al. Uterine damage induces placenta accreta and immune imbalance at the maternal-fetal interface in the mouse. *Placenta.* 2022;119:8–16. DOI: 10.1016/j.placenta.2022.01.002.
12. Kawashima A, Sekizawa A, Ventura W, Koide K, Hori K, Okai T et al. Increased levels of cell-free human placental lactogen mRNA at 28–32 gestational weeks in plasma of pregnant women with placenta previa and invasive placenta. *Reprod Sci.* 2014;21(2):215–20. DOI: 10.1177/1933719113492209.
13. Патологическое прикрепление плаценты (предлежание и вращение плаценты). Клинические рекомендации. Москва, 2023. Доступно по адресу: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/767_1 (получено 13.05.2024).
14. Старосветская Н.А., Назимова С.В., Степанова И.И., Степанов А.А., Болтовская М.Н. Получение комплекса моноклональных антител для иммуногистохимических исследований в области физиологии и патологии репродукции. Клиническая и экспериментальная морфология. 2012;2:22–27. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17919938> (получено 13.05.2024).
15. Starosvetskaya NA, Nazimova SV, Stepanova II, Stepanov AA, Boltovskaya MN. Production of monoclonal antibodies set for immunohistochemical studies in the field of physiology and pathology of human reproduction. *Clinical and experimental morphology.* 2012;2:22–27 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17919938> (accessed 13.05.2024).
16. Li J, Zhang N, Zhang Y, Hu X, Gao G, Ye Y et al. Human placental lactogen mRNA in maternal plasma play a role in prenatal diagnosis of abnormally invasive placenta: yes or no? *Gynecol Endocrinol.* 2019;35(7):631–4. DOI: 10.1080/09513590.2019.1576607.
17. Blois SM, Sulkowski G, Tirado-González I, Warren J, Freitag N, Klapp BF et al. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):348–58. DOI: 10.1038/mi.2013.53.
18. You Y, Stelzl P, Joseph DN, Aldo PB, Maxwell AJ, Dekel N et al. TNF- α regulated endometrial stroma secretome promotes trophoblast invasion. *Front Immunol.* 2021;12:737401. DOI: 10.3389/fimmu.2021.737401.
19. Wang Z, Zibrila AI, Liu S, Zhao G, Li Y, Xu J et al. Acetylcholine ameliorated TNF- α -induced primary trophoblast malfunction via muscarinic receptors. *Biol Reprod.* 2020;103(6):1238–48. DOI: 10.1093/biolre/iaaa158.

19. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV. The emerging role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in tumor progression and metastasis. *Front Immunol.* 2020;11:1749. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01749.
20. Yang Y, Wu N. Gestational diabetes mellitus and preeclampsia: correlation and influencing factors. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:831297. DOI: 10.3389/fcvm.2022.831297.
21. El-Badawy O, Abbas AM, Radwan E, Makboul R, Khamis AA, Ali M et al. Cross-talk between mucosal-associated invariant T, natural killer, and natural killer T cell populations is implicated in the pathogenesis of placenta accreta spectrum. *Inflammation.* 2023;46(4):1192–208. DOI: 10.1007/s10753-023-01799-1.
22. AbdelFattah S, Morsy M, Ahmed AM, Abdelsalam H, Hosny G. Microcellular approach for the pathogenesis of placenta accreta spectrum inflammatory versus apoptotic pathways; a thorough look on Treg, dNK and VEGF. *Pathol Res Pract.* 2024;254:155153. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155153.
23. Aneman I, Pienaar D, Suvakov S, Simic TP, Garovic VD, McClements L. Mechanisms of key innate immune cells in early- and late-onset preeclampsia. *Front Immunol.* 2020;11:1864. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01864.
24. Janssen M, Rijvers L, Koetzier SC, Wierenga-Wolf AF, Melief MJ, van Langelaar J et al. Pregnancy-induced effects on memory B-cell development in multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2021;11(1):12126. DOI: 10.1038/s41598-021-91655-9.
25. Makrydimas G, Plachouras N, Higuera MT, Thilaganathan B, Nicolaides K. Maternal peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal and pathological pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 1994;9(6):371–8. DOI: 10.1159/000264068.

Информация об авторах

Ильяс Александрович Куликов – кандидат медицинских наук, заведующий акушерским отделением патологии беременности Видновского перинатального центра.

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

Андрей Павлович Александркин – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Екатерина Романовна Милютина – врач акушерского отделения патологии беременности Видновского перинатального центра.

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

Наталья Викторовна Низяева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологии репродукции 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.

Author information

Ilyas A. Kulikov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Perinatal Pathology, Vidnoye Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0002-2460-1623>

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

Andrey P. Aleksankin – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>

Ekaterina R. Milyutina – Obstetrician, Department of Perinatal Pathology, Vidnoye Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0003-2701-0607>

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

Natalia V. Nizyaeva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-5592-5690>

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”.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Морфометрический анализ сетчатки глаза крыс при хроническом стрессе в условиях измененной иммунореактивности

А.А. Нестерова¹, А.О. Довгалева², И.И. Прокофьев¹, В.Н. Перфилова¹, И.Н. Тюренков¹

¹ ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, Волгоград, Россия

² АО Семейный доктор, поликлиника № 6, Москва, Россия

Резюме. Введение. Одной из особенностей развития современного общества является увеличение влияния на человека психосоциальных факторов, вызывающих стресс-реакцию, которая обуславливает различные морфофункциональные нарушения тканей, в частности сетчатой оболочки глаза. В результате избытка катехоламинов и глюкокортикоидов при стрессе повреждаются нейроны сетчатки глаза, что приводит к потере зрения. В литературе приводятся противоречивые данные о влиянии измененной иммунореактивности на выраженность стресс-ассоциированных изменений органов и тканей, в частности сетчатки, уточнение которых и послужило целью настоящей работы.

Материалы и методы. Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар, которые были разделены на группы по восемь животных в каждой: 1-я – интактные животные; 2-я – интактные крысы, которым был введен неспецифический иммуноген – эритроциты барана (500 млн клеток в 500 мкл физиологического раствора); 3-я – самцы, подвергавшиеся стрессовому воздействию в течение 7 дней ежедневно по 30 минут со сменой звуковых и световых стрессорных раздражителей; 4-я – животные, которым после стрессового воздействия была выполнена иммунизация. Оценивали изменение микроструктурных и морфометрических параметров сетчатки с использованием световой микроскопии, а также концентрации интерлейкина-6 (ИЛ-6), кортикостерона, адренкортикотропного гормона (АКТГ) и кортикотропин-релизинг-гормона в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

Результаты. У животных после стрессового воздействия при микроскопическом исследовании отмечались нарушение стратификации слоев, уменьшение ширины наружного и внутреннего ядерных слоев, гиподенситивность и появление «пустых» участков в слоях сетчатки, а также гиперхромных и гидропически измененных нейронов. У животных после стрессового воздействия и введения неспецифического антигена не выявлялись резкие изменения в гистологическом строении сетчатки, что подтверждено морфометрическими расчетами. Также иммунизация приводила к снижению уровня ИЛ-6 в сыворотке крови стрессированных крыс и вызывала сохранение концентрации гормонов стресса на значимо низком уровне, не отличающемся от такового у интактных самцов.

Заключение. Иммунизация корпускулярным антигеном на фоне хронического стрессирования способствует сохранению цитоархитектоники сетчатки глаза, а также тормозит стресс-ассоциированную активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

Ключевые слова: хронический стресс, сетчатка, иммунизация

Для корреспонденции: Игорь Игоревич Прокофьев. E-mail: igor.prokofiev@mail.ru

Для цитирования: Нестерова А.А., Довгалева А.О., Прокофьев И.И., Перфилова В.Н., Тюренков И.Н. Морфометрический анализ сетчатки глаза крыс при хроническом стрессе в условиях измененной иммунореактивности. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):53–60. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.53-60.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 18.09.2023. Получена после рецензирования 05.10.2023. Принята в печать 20.11.2023.

Retinal morphometric analysis of the chronically stressed rats with altered immunoreactivity

А.А. Nesterova¹, А.О. Dovgaleva², I.I. Prokofiev¹, V.N. Perfilova¹, I.N. Tyurenkov¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

² JSC “Family Doctor”, Clinic No. 6, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Chronic stress is an integral part of a modern industrial society. Chronic stress affects both physical and psychological well-being by causing various morphological and functional changes

in different organ tissues, including the retina. As a result of an excess of catecholamines and glucocorticoids, retinal neurons become damaged, which leads to visual impairment. There are controversial data on how altered immunoreactivity affects the severity of stress-associated changes in organs and tissues, particularly in the retina. Thus, we aimed to study stress-associated changes in the retina.

Materials and methods. We performed experiments on 32 Wistar male rats, which were divided into 4 equal groups, group 1 including intact animals. Group 2 consisted of the intact rats that received one injection of a nonspecific immunogen, i.e., ram erythrocytes (500 million cells per 500 microliters of saline). The rats from group 3 were exposed to light and sound stress for 30 minutes 7 days running. The stressed animals that were injected once with a nonspecific immunogen on day 3 of stress exposure comprised group 4. We assessed changes in the microstructural parameters of the retina using light microscopy and measuring interleukin-6 (IL-6), cortisol, adrenocorticotrophic hormone, and corticotropin-releasing hormone in blood serum with enzyme immunoassay.

Results. Among the stress-exposed animals, microscopic examination revealed a disruption of the retinal stratification, decreased width of the outer and inner nuclear layers, hypocellularity, “empty” sites in retinal layers, as well as hyperchromically and hydropically altered neurons. In contrast, there were no obvious retinal defects in the stressed animals that received a nonspecific antigen, which was confirmed morphometrically. The immunization was correlated with decreased IL-6 in the blood serum of the stressed rats. The results of blood tests showed a significantly low level of stress-associated hormones, which was not different from that in the intact animals.

Conclusion. Nonspecific immunization of laboratory rats under chronic stress leads to preserved retinal cytoarchitectonics and inhibits stress-induced activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system.

Keywords: chronic stress, retina, immunization

Corresponding author: Igor I. Prokofiev. E-mail: igor.prokofiev@mail.ru

For citation: Nesterova A.A., Dovgalev A.O., Prokofiev I.I., Perfilova V.N., Tyurenkov I.N. Retinal morphometric analysis of the chronically stressed rats with altered immunoreactivity. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):53–60 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.53-60.

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

Received 18.09.2023. **Received in revised form** 05.10.2023. **Accepted** 20.11.2023.

Введение

В современном обществе стресс сопровождает человека всю его жизнь, негативно влияя на ее качество [1]. Как показано многими специалистами, в том числе основоположником теории стресса Гансом Селье, хроническое стрессорное воздействие запускает в организме каскад интегрированных реакций нервной, эндокринной и иммунной систем, которые стимулируют патофизиологические механизмы, отвечающие за возникновение и развитие нейродегенеративных процессов, ведущих к гибели нервной ткани, образующей в том числе сетчатку оболочку глаза [2–3]. Усиленное влияние симпатической нервной системы и высокий уровень глюкокортикоидов приводят к дисрегуляции тонуса сосудов сетчатки и прямому повреждению ее нейронов, вызывая снижение функций органа зрения [4]. Кроме того, активация симпатоадреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем ведет к окислительному стрессу и воспалительным реакциям, что играет важную роль в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний сетчатки глаза [5].

В свою очередь, активация иммунной системы также вызывает нейроэндокринные изменения, что позволяет предположить более выраженную негативную реакцию со стороны организма в ответ на хроническое стрессирование, что, вероятно, еще больше должно усугублять нейродегенерацию [6–7]. Тем не менее в литературе

описаны результаты исследований, демонстрирующие положительное влияние иммунокомпрометирующих состояний на стресс-ассоциированные изменения нервной ткани. Имеются данные об уменьшении тяжести поражения центральной нервной системы (ЦНС) вследствие модуляции микроглии, несмотря на ее активное вовлечение в патогенетический путь развития нейродегенерации. Авторы объясняют данный эффект различными механизмами, включающими, например, активацию регулируемого интерфероном сигнального пути, а также предотвращение нейровоспалительных реакций [8].

Таким образом, данные литературы об участии иммунной системы в стресс-ассоциированном повреждении сетчатки глаза имеют противоречивый характер и требуют уточнения.

В связи с этим целью нашего исследования стало изучение морфометрических показателей сетчатой оболочки глаза экспериментальных животных, подвергшихся хроническому стрессированию, на фоне иммунизации корпускулярным антигеном.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 32 аутбредных крысах – самцах породы Вистар с исходной массой до стрессирования 360–380 граммов, содержащихся в стандартных условиях вивария

со свободным доступом к воде и пище с 12-часовым световым днем согласно требованиям ГОСТ Р-33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», рекомендациям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), и директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования был одобрен региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (протокол 2095-2019 от 25.01.2019).

Были сформированы четыре группы по восемь особей в каждой: 1-я – интактные животные (группа «интакт»); 2-я – интактные крысы, которым был введен неспецифический иммуноген (группа «иммунизация»); 3-я – самцы, подвергшиеся хроническому стрессированию (группа «стресс»); 4-я – стрессированные животные с иммунизацией (группа «стресс + иммунизация»).

Для моделирования стрессовой ситуации экспериментальные животные подвергались хроническому неизбежному стрессу по методике, описанной в нашей предыдущей работе [9]. Адекватность модели оценивали по изменению массы животного, тимуса и надпочечников. Животных выводили из эксперимента на седьмые сутки путем декапитации. После вскрытия желудка определяли степень поражения его слизистой оболочки и выражали в баллах (0 баллов – отсутствие поражений, 1 балл – эрозии, 2 балла – единичные язвы, 3 балла – множественные язвы, 4 балла – прободные язвы).

Иммунизацию животных осуществляли тимус-зависимым корпускулярным антигеном – эритроцитами барана однократно внутрибрюшинно в дозе 500 млн клеток в 500 мкл физиологического раствора на третий день от начала стрессирования. Самцам групп без иммунизации в аналогичном режиме вводили физиологический раствор. У наркотизированных животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) после декапитации энуклеировали глаза, выполняли гистологическую проводку по стандартной методике, описанной в ранее проведенном исследовании [9]. Переднезаднюю секцию глаз осуществляли по методике В.Н. Архангельского [10]. С помощью ротационного микротоме Leica 2125 (Leica Biosystems, Германия) готовили срезы толщиной 6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и толуидиновым голубым по методу Ниссля. Количество клеток на единицу площади и площадь нейронов в наружном и внутреннем ядерных слоях сетчатки подсчитывали при увеличении объектива $\times 40$, в 10 случайных участках, размером 512×512 пикселей, на отрезке сетчатой оболочки длиной 700 мкм, расположенном на расстоянии 800 мкм от края диска зрительного нерва с височной стороны. Для получения изображений сетчатки и их морфометрического анализа использовались камера Tucsen 1000 (Xintu Photonics Ltd (Tucsen), КНР) и программа Image-Pro Plus (Media Cybernetics,

США). Числовые значения площади клеток получали путем очерчивания клетки контуром вручную по их периметру на участках сетчатки, описанных выше. Определение нейроэндокринного и цитокинового статуса проводили с использованием наборов фирмы Cusabio-Rat (КНР) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Исследовали следующие показатели: кортикотропин-рилизинг-гормон (КТРГ), адренотропный гормон (АКТГ), кортикостерон, интерлейкин-6 (ИЛ-6). Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики пакета программ Statistica 12 (Statsoft, США). Данные были проверены на нормальность распределения с помощью критериев Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова. Для определения статистической значимости отличий между группами применяли критерий Краскела–Уоллиса с пост-хок тестом Данна. Достоверными считали различия при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

После хронического стрессорного воздействия у животных наблюдалась характерная триада, связанная с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы: инволюция тимуса, гиперплазия надпочечников и эрозивно-язвенное поражение слизистой оболочки желудка. При иммунизации на фоне стресса отмечена тенденция к сохранению веса животными, а также массы тимуса, надпочечников и состояния слизистой оболочки желудка (табл. 1).

Микроскопический и морфометрический анализ продемонстрировал выраженные нейродегенеративные процессы в сетчатке животных, подвергшихся хроническому мультимодальному стрессированию. При исследовании сетчатой оболочки отмечались нарушение стратификации слоев, уменьшение ширины наружного и внутреннего ядерных слоев, гиподенситетность и появление «пустых» участков в слоях сетчатки, а также гиперхромных и гидропически измененных нейронов (рис. 1). Численная плотность клеток (ЧПК) в наружном ядерном слое (НЯС) у животных этой экспериментальной группы уменьшилась по сравнению с интактными животными на 47%, а во внутреннем ядерном слое (ВЯС) – на 42% (табл. 2). Микроскопическая картина сетчатой оболочки глаза у животных группы «стресс + иммунизация» не обнаруживала резких отклонений от таковых у интактных самцов, что подтвердили морфометрические расчеты (табл. 2). В НЯС и ВЯС у животных данной группы ЧПК была меньше в среднем на 13,5 и 7,1%, соответственно, по сравнению с интактными животными и на 63,3 и 60,5%, соответственно, выше относительно таковой у стрессированных крыс (рис. 1, табл. 2). В своей предыдущей работе мы отмечали аналогичные изменения при хроническом стрессорном воздействии относительно толщины НЯС и ВЯС. Толщина слоев в данном случае коррелировала с численной плотностью клеток,

что свидетельствует о повреждении сетчатки глаза при хроническом стрессе [7].

Как известно, дистрофические изменения в клетке определяют необратимые процессы, ведущие к гибели ткани. С учетом того, что дистрофия нейронов проявляется таким морфологическим признаком как острое набухание, нами была рассчитана средняя пло-

щадь клеток в наружном и внутреннем ядерных слоях сетчатки (табл. 2). Выявлено, что средняя площадь клеток НЯС и ВЯС в сетчатке у животных в группе «стресс» увеличилась практически в 2 раза по сравнению с таковой у интактных самцов, что предполагает вероятное развитие дистрофических изменений в нейронах сетчатки глаза под воздействием хронического

Таблица 1 | Table 1

Изменение веса экспериментальных животных, массы тимуса и правого надпочечника, поражения слизистой оболочки желудка животных исследуемых групп (M±SD, для показателя «Степень поражения слизистой оболочки желудка» – Me [Q1; Q3]) | The changes in the weight of the experimental animals, the weight of the thymus and right adrenal gland; the lesions of gastric mucosa in the animals of the studied groups (M±SD, for the parameter “Degree of gastric mucosa damage” – Me [Q1; Q3])

Группы Groups	Средняя масса животного, г Average animal weight, g	Средняя масса тимуса, г Average weight of the thymus, g	Средняя масса правого надпочечника, г Average weight of the right adrenal gland, g	Степень поражения слизистой оболочки желудка, средний балл Degree of damage to the gastric mucosa, average score
Группа 1 (n=8) Group 1	370±30	0,62±0,06	0,020±0,004	0 (0; 0)
Группа 2 (n=8) Group 2	367±22	0,58±0,03	0,034±0,005	0 (0; 0)
Группа 3 (n=8) Group 3	330±15*	0,41±0,05*	0,032±0,009*	2,5 (2; 3)
Группа 4 (n=8) Group 4	350±20	0,48±0,03#	0,026±0,002	1,5 (1; 2)

Изменения статистически значимы (критерий Краскела–Уоллиса с пост-хок тестом Данна, $p < 0,05$) относительно: * интактных животных; # стрессированных крыс без иммунизации.

The changes are statistically significant (Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-hoc test, $p < 0,05$) relative to * intact animals (Group 1), # stressed rats without immunization (Group 3).

Таблица 2 | Table 2

Численная плотность и средняя площадь клеток в наружном и внутреннем ядерных слоях сетчатки глаза крыс исследуемых групп | Cell density and average cell size in the outer and inner nuclear retinal layers in the rats of the studied groups

Группы Groups	Численная плотность клеток в НЯС Cell density in the outer nuclear layer	Численная плотность клеток в ВЯС Cell density in the inner nuclear layer	Средняя площадь клеток в НЯС, мкм ² Average cell size in the outer nuclear layer, μm ²	Средняя площадь клеток в ВЯС, мкм ² Average cell size in the inner nuclear layer, μm ²
Группа 1 (n=8) Group 1	68,0±3,1	28,1±0,6	9,7±1,5	11,2±2,1
Группа 2 (n=8) Group 2	56,6±1,2*	24,2±0,7	11,9±2,9	13,8±2,2
Группа 3 (n=8) Group 3	36±1,3*	16,2±0,9*	19,8±2,6*	23,1±1,6*
Группа 4 (n=8) Group 4	58,8±2,1#	26,4±0,9#	11,5±2,0#	13,6±1,7#

Изменения статистически значимы (критерий Краскела–Уоллиса с пост-хок тестом Данна, $p < 0,05$) относительно:

* интактных животных; # стрессированных крыс без иммунизации.

НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой

The changes are statistically significant (Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-hoc test, $p < 0,05$) relative to * intact animals (Group 1), # stressed rats without immunization (Group 3).

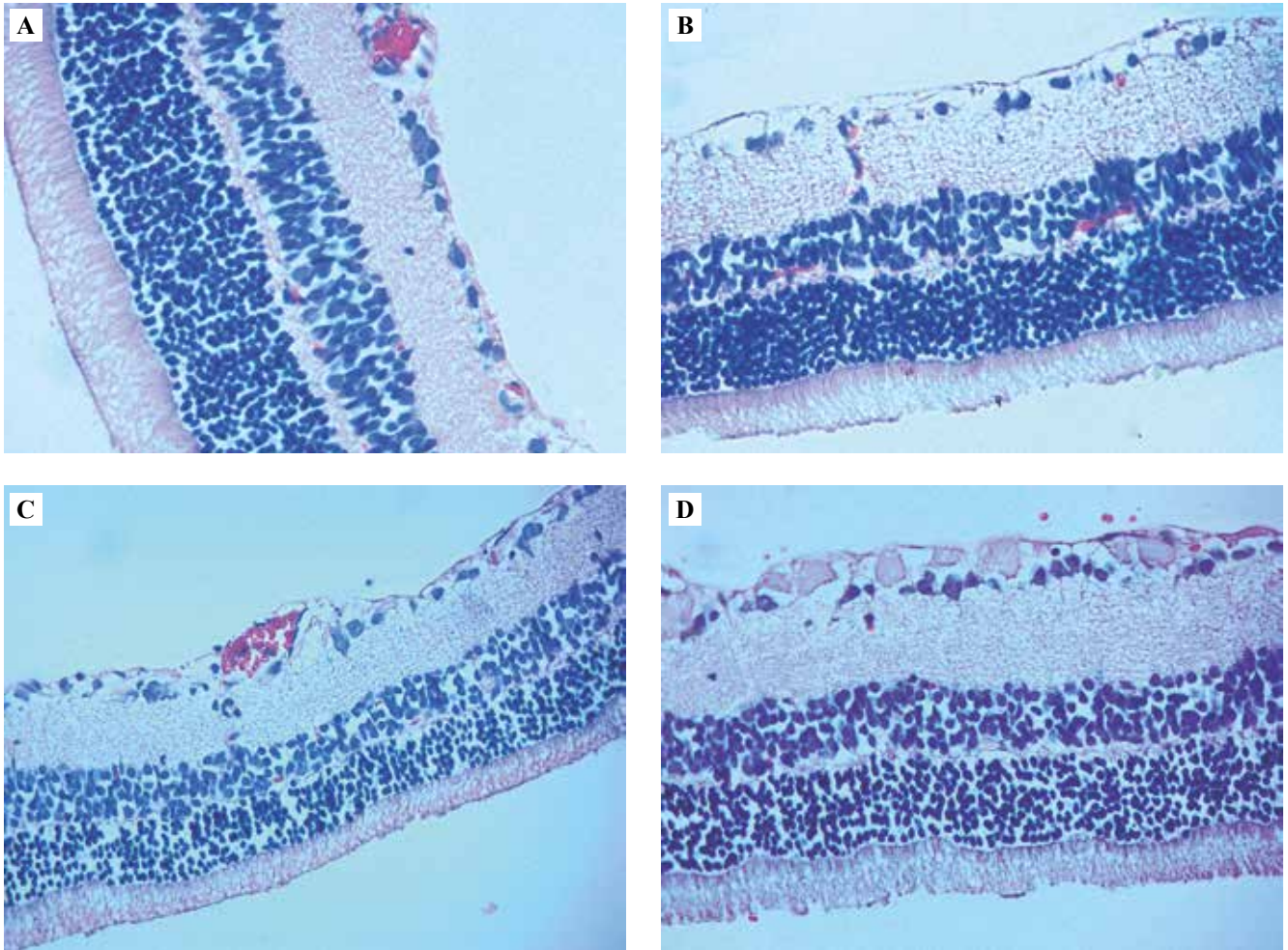


Рис. 1. Микроскопическая картина сетчатки глаза.

А – интактные животные, В – группа «интакт + иммунизация», С – группа «стресс», D – группа «стресс + иммунизация». Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 1. The retinal microscopic picture.

A – intact animals (Group 1), B – intact + immunization group (Group 2), C – stressed animals (Group 3), D – stress + immunization group (Group 4). H&E stain, $\times 400$

комбинированного стрессора. В группе «стресс + иммунизация» клеточная площадь в НЯС и ВЯС была меньше на 41,9 и 41,1%, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями группы стрессированных животных. Морфометрический анализ показал, что площадь клеток сетчатки у иммунизированных животных без воздействия стрессорного фактора практически не отличалась от этого показателя у интактных крыс. На основании полученных данных можно сделать вывод о положительном влиянии иммунизации на морфометрические показатели сетчатки глаза экспериментальных животных при хроническом стрессе.

О позитивной роли иммунизации свидетельствует и анализ изменения концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 и гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. У иммунизированных стрессированных животных выявлено снижение уровня ИЛ-6 в периферической крови на 32,4% отно-

сительного такового у крыс группы «стресс» (табл. 3). При этом полученные данные об уровне стресс-ассоциированных гормонов продемонстрировали, что хроническое стрессорное воздействие приводит к увеличению концентрации кортикостерона, АКТП и КТРГ на 79,2, 50,0 и 30,0%, соответственно. Иммунизация корпускулярным антигеном вызывала сохранение концентрации исследуемых гормонов в плазме крови стрессированных животных на значимо низком уровне, статистически не отличающемся от такового у интактных самцов (табл. 3).

Обсуждение

Современная теория стресса утверждает, что взаимодействие нервной, иммунной и эндокринной систем определяет его парадигму, которая зависит от таких ключевых медиаторов как кортикостероиды, катехоламины и цитокины. Взаимодействие нервной и им-

Уровни ИЛ-6 и гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в сыворотке экспериментальных и контрольных животных | Levels of IL-6 and hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the serum of the experimental and control animals

Группы Groups	ИЛ-6, пг/мл IL-6, pg/ml	Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	АКТГ, пг/мл ACTH, pg/ml	КТРГ, нг/мл CRH, ng/ml
Группа 1 Group 1	3,0±0,2	14,4±2,2	11,0±2,5	0,40±0,08
Группа 2 Group 2	3,2±0,4	16,4±2,0	14,0±3,1	0,47±0,10
Группа 3 Group 3	3,7±0,4*	25,8±3,8*	16,5±1,9*	0,52±0,11*
Группа 4 Group 4	2,5±0,3#	18,6±2,2#	13,5±1,5#	0,41±0,09#

Изменения статистически значимы (критерий Краскела–Уоллиса с пост-хок тестом Данна, $p < 0,05$) относительно:

* – интактных животных; # – стрессированных крыс без иммунизации

ИЛ-6 – интерлейкин-6, АКТГ – аденокортикотропный гормон, КТРГ – кортикотропин-рилизинг гормон

The changes are statistically significant (Kruskal–Wallis test with Dunn's post-hoc test, $p < 0.05$) relative to * intact animals (Group 1), # stressed rats without immunization (Group 3)

IL-6 – interleukin-6, ACTH – adrenocorticotropic hormone, CRH – corticotropin-releasing hormone

мунной систем опосредуется перечисленными выше гуморальными факторами и межклеточными рецепторопосредованными контактами [2, 3]. Напряжение иммунной реактивности при стрессе вызывает трансформацию нейроэндокринных изменений в организме [11]. Иммунный ответ является реакцией организма на стресс, что определяется высвобождением гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и других медиаторов и вызывает общие и локальные эффекты. Как было показано рядом исследователей, в эксперименте у стрессированных животных, подвергшихся иммунизации корпускулярным антигеном, не наблюдалось увеличения числа лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови в отличие от неиммунизированных стрессированных животных [7]. Полученные нами результаты согласуются с указанными данными и свидетельствуют об ограничении негативного влияния стресс-реакции на организм в целом и на сетчатку в частности. Тем не менее в этой же работе продемонстрирована тенденция к увеличению уровня стресс-гормонов под влиянием иммунизации на фоне хронического стрессорного воздействия. Разнонаправленность полученных результатов можно объяснить разным генетически обусловленным уровнем активности стресс-лимитирующих систем, определяющих индивидуальную стрессоустойчивость животных [12].

Известно, что важнейшим компонентом иммунной системы в нервной ткани является микроглия, участвующая в защите от различных повреждений, однако в настоящее время нет единого мнения относительно ее роли в процессе нейродегенерации. Отмечается как нейротоксический, так и нейротрофический эффект микроглиального окружения на нейроны. Одни исследователи обнаруживают уменьшение дегенерации ретинальных нейроцитов при супрессии микроглии, в то время как другие показывают положительное нейротрофическое влияние активированных микроглиальных

клеток на фоторецепторы, причем их активация в сетчатке происходит в результате прямых межклеточных контактов с локальными Т-лимфоцитами [13–16]. Было показано, что Т-лимфоциты способны пересекать гематоретинальный барьер и устанавливать контакты с микроглиальными клетками. Тем не менее разные исследовательские группы сходятся в одном – микроглия сетчатки является тем посредником, который обеспечивает двустороннюю связь между сетчаткой и нервной тканью с одной стороны и иммунной системой организма с другой стороны [16–19]. С этой точки зрения логично утверждать, что любое напряжение иммунитета, подобное таковому, которое развивается при иммунизации и/или стрессе, имеет свое отражение в структурах сетчатки оболочки через ее модуляцию в соответствии с принятым сигналом из ЦНС. Отмечается, что клетки микроглии в ответ на активацию увеличивают экспрессию TNF- α , индукцибельной NO-синтазы и Fas-лиганда, а также участвуют в аутоиммунных процессах. Кроме того, важную роль в инициации иммунных реакций играют дендритные клетки, участвующие в генерировании цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов [20]. Хронический стресс, вероятно через задействование общих иммуноэндокринных и локальных механизмов, опосредованных микроглией, вызывает нейродегенеративные процессы и гибель клеток сетчатки.

Объяснение механизма нейротрофического действия иммунизации требует детальной проработки, однако в некоторых работах авторы пришли к выводу, что иммунизация стимулирует дифференцировку регуляторных Т-клеток, которые способны проникать в нервную ткань, включая сетчатку, и блокировать эффекторные иммунные клетки [19]. Приведенные данные коррелируют с результатами другого исследования, демонстрирующими участие CD4+CD25+ регуляторных Т-лимфоцитов при иммунизации. Эти

клетки способны подавлять локальный иммунный ответ и поддерживать иммунный гомеостаз через модуляцию активности микроглиальных элементов, которые при иммунизации переключают свой фенотип с CD200R+ на иммунотолерантный CD154+, CD103+ и CD54+, способный блокировать активацию клеточной гибели, что может быть объяснением полученных нами результатов [17].

Заклучение

Хроническое стрессирование приводит к выраженным изменениям сетчатки глаза животных, проявляющихся в нарушении строения клеточных слоев, уменьшении количества нейронов на единицу площади в наружном и внутреннем ядерных слоях, увеличении площади клеток. У самцов, подвергшихся стрессу, значительно повышается уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6, а также концентрации гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Иммунизация стрессированных крыс способствует сохранности цитоархитектоники сетчатой оболочки, что сопровождается поддержанием концентрации стресс-ассоциированных гормонов на значимо низком уровне. Полученные данные могут стать основой для дальнейшего определения механизма стрессорного повреждения сетчатки, а также разработки новых терапевтических мишеней торможения нейродегенерации в сетчатой оболочке глаза.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, А.А. Нестерова.
Сбор и обработка материала – А.А. Нестерова, А.О. Довгалева, И.И. Прокофьев.
Написание текста – А.А. Нестерова, И.И. Прокофьев.
Редактирование – И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – I.N. Tyurenkov, V.N. Perfilova, A.A. Nesterova.
Collected the data and performed the analysis – A.A. Nesterova, A.O. Dovgalev, I.I. Prokofiev.
Wrote the paper – A.A. Nesterova, I.I. Prokofiev.
Edited the manuscript – I.N. Tyurenkov, V.N. Perfilova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interests.

Литература/References

1. *Parsaei R, Roohafza H, Feizi A, Sadeghi M, Sarrafzadegan N.* How different stressors affect quality of life: an application of multilevel latent class analysis on a large sample of industrial employees. *Risk Manag Healthc Policy.* 2020;13:1261–70. DOI: 10.2147/RMHP.S256800.
2. *Selye H.* Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* 1950;1(4667):1383–92. DOI: 10.1136/bmj.1.4667.1383.
3. *Haykin H, Rolls A.* The neuroimmune response during stress: a physiological perspective. *Immunity.* 2021;54(9):1933–47. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.08.023.
4. *Sabel BA, Wang J, Cárdenas-Morales L, Faiq M, Heim C.* Mental stress as consequence and cause of vision loss: the dawn of psychosomatic ophthalmology for preventive and personalized medicine. *EPMA J.* 2018;9(2):133–60. DOI: 10.1007/s13167-018-0136-8.
5. *Jadeja RN, Martin PM.* Oxidative stress and inflammation in retinal degeneration. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(5):790. DOI: 10.3390/antiox10050790.
6. *McCusker RH, Kelley KW.* Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol.* 2013;216(Pt. 1):84–98. DOI: 10.1242/jeb.073411.
7. *Тюренков И.Н., Филина И.С., Гумилевский Б.Ю., Волотова Е.В., Бакулин Д.А.* Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных. *Фундаментальные исследования.* 2014;7-2:368–371. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21736733> (получено 14.09.2023).
8. *Tyurenkov IN, Filina IS, Gumilevskiy BY, Volotova EV, Bakulin DA.* The influence of immunization on adaptation by chronic stress of animals. *Fundamental Research.* 2014;7-2:368–371 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21736733> (accessed 14.09.2023).
9. *Gu Y, Ye T, Tan P, Tong L, Ji J, Gu Y et al.* Tolerance-inducing effect and properties of innate immune stimulation on chronic stress-induced behavioral abnormalities in mice. *Brain Behav Immun.* 2021;91:451–71. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.11.002.
10. *Нестерова А.А., Ермилов В.В., Тюренков И.Н., Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Загребин В.Л. и др.* Характеристика сетчатки глаза при хроническом стрессе у лабораторных крыс разных возрастных групп. *Морфология.* 2016;149(1):43–47. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25621262> (получено 14.09.2023).
11. *Nesterova AA, Yermilov VV, Tyurenkov IN, Smirnov AV, Grigoriyeva NV, Zagrebina VL et al.* Characteristics of the retina in chronic stress in laboratory rats of different age groups. *Morphology.* 2016;149(1):43–47 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25621262> (accessed 14.09.2023).
12. *Архангельский В.Н.* Введение к микроскопическому исследованию глаза. Москва: ГУ, 1926. 103 с.
13. *Arkhangelskii VN.* Introduction to microscopic examination of the eye. Moscow: GU, 1926. 103 p. (In Russ.).
14. *Sundareswaran L, Srinivasan S, Wankhar W, Sheeladevi R.* Effect of Scoparia dulcis on noise stress induced adaptive immunity and cytokine response in immunized Wistar rats. *J Ayurveda Integr Med.* 2017;8(1):13–9. DOI: 10.1016/j.jaim.2016.10.004.
15. *Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Прокофьев И.И.* Влияние иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия на животных с различным фенотипом реагирования в условиях блокады NO-синтазы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016;6-2:292–296. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25997074> (получено 14.09.2023).
16. *Tyurenkov IN, Perfilova VN, Prokofiev II.* Influence of immobilization-painful stress on animals with different phenotypes response in the conditions NO-synthase blockade. *International Journal of Applied and Fundamental Research.* 2016;6-

- 2:292–296 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25997074> (accessed 14.09.2023).
13. Guo L, Choi S, Bikkannavar P, Cordeiro MF. Microglia: key players in retinal ageing and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:804782. DOI: 10.3389/fncel.2022.804782.
 14. Fernández-Albarral JA, Salobrar-García E, Martínez-Páramo R, Ramírez AI, de Hoz R, Ramírez JM et al. Retinal glial changes in Alzheimer's disease – a review. *J Optom.* 2019;12(3):198–207. DOI: 10.1016/j.optom.2018.07.001.
 15. Fischer AJ, Zelinka C, Milani-Nejad N. Reactive retinal microglia, neuronal survival and the formation of retinal folds and detachments. *Glia.* 2015;63(2):313–27. DOI: 10.1002/glia.22752.
 16. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol.* 2007;81(6):1345–51. DOI: 10.1189/jlb.0207114.
 17. Christiansen JR, Olesen MN, Otzen DE, Romero-Ramos M, Sanchez-Guajardo V. α -Synuclein vaccination modulates regulatory T cell activation and microglia in the absence of brain pathology. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):74. DOI: 10.1186/s12974-016-0532-8.
 18. Ferrer-Martín RM, Martín-Oliva D, Sierra-Martín A, Carrasco MC, Martín-Estebané M, Calvente R et al. Microglial activation promotes cell survival in organotypic cultures of post-natal mouse retinal explants. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135238. DOI: 10.1371/journal.pone.0135238.
 19. Avidan H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, Schwartz M. Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(12):3434–45. DOI: 10.1002/eji.200424883.
 20. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В. Роль дендритных и тучных клеток кожи в развитии иммунных реакций. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2021;10(1):5–10. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.510.
Yaglova NV, Obernikhin SS, Yaglov VV, Nazimova SV. Role of skin dendritic and mast cells communications in triggering immune reactions. *Clinical experimental morphology.* 2021;10(1):5–10 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.510.

Информация об авторах

Алла Анатольевна Нестерова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии Волгоградского государственного медицинского университета.

Андрей Олегович Довгалеv – врач-офтальмолог поликлиники № 6 АО «Семейный доктор».

Игорь Игоревич Прокофьев – кандидат медицинских наук, доцент кафедры судебной медицины Волгоградского государственного медицинского университета.

Валентина Николаевна Перфилова – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования Волгоградского государственного медицинского университета.

Иван Николаевич Тюренков – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования Волгоградского государственного медицинского университета.

Author information

Alla A. Nesterova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Theoretical Biochemistry and Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-7249-3906>

Andrey O. Dovgalev – Ophthalmologist, Clinic No. 6, JSC “Family Doctor”.

<https://orcid.org/0009-0005-2212-0948>

Igor I. Prokofiev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Forensic Medicine, Volgograd State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-7939-8212>

Valentina N. Perfilova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Professor, Department of Pharmacology and Pharmacy, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-2457-8486>

Ivan N. Tyurenkov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Pharmacology and Pharmacy, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University.

<http://orcid.org/0000-0001-7574-3923>

Гистологические и иммуногистохимические изменения префронтальной коры головного мозга мышей под действием дексаметазона

Д.К. Соколов¹, Г.М. Казанская¹, А.М. Волков², А.В. Строкотова¹,
Е.Э. Кливер^{2,3}, Э.В. Григорьева¹, С.В. Айдагулова^{1,3}

¹ Институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Новосибирск, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

Резюме. *Введение.* Воздействие синтетического глюкокортикоида дексаметазона на органы-мишени опосредовано взаимодействием с глюкокортикоидным рецептором, но эффекты препарата на интактный мозг исследованы недостаточно. Цель работы – изучить в эксперименте динамику воздействия двух дозировок дексаметазона на тканевые изменения и содержание глюкокортикоидного рецептора в префронтальной коре.

Материалы и методы. Мыши-самцы C57Bl/6 в возрасте 7–8 недель получали однократную или многократные внутривенные инъекции дексаметазона в дозах 1,0 или 2,5 мг/кг. Структурные изменения префронтальной коры изучали в динамике до 90 суток после инъекций на парафиновых срезах. Содержание глюкокортикоидного рецептора (ГР, NR3C1) изучали методом иммуногистохимии с помощью количественного анализа.

Результаты. Гистологическое исследование выявило отсутствие явной дозовой зависимости и обратимость дистрофических и гидропических изменений префронтальной коры, наиболее выраженных при однократном введении препарата на 7-е сутки, а при многократном на 15-е сутки эксперимента, с возвращением к исходной тканевой архитектонике, соответствующей таковой у животных контрольных групп. Содержание глюкокортикоидного рецептора при однократном введении дексаметазона в дозе 2,5 мг/кг статистически значимо ($p < 0,05$) возрастало на 3-и и 10-и сутки по сравнению с контрольной группой, тогда как после многократных инъекций дексаметазона уменьшалось на 15-е сутки эксперимента, но к 30-м суткам возвращалось на исходный уровень.

Заключение. Стереотипные дистрофические и гидропические изменения префронтальной коры в условиях воздействия двух разных режимов и доз дексаметазона развивались на 7-е и на 15-е сутки. При этом выявлен противоположный эффект режимов введения дексаметазона в дозе 2,5 мг/кг на содержание глюкокортикоидного рецептора относительно контрольной группы: при однократном введении на 10-е сутки оно возрастало на 8,1%, а при многократном уменьшалось на 15-е сутки на 9,9%.

Ключевые слова: дексаметазон, глюкокортикоиды, головной мозг, префронтальная кора, глюкокортикоидный рецептор, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Светлана Владимировна Айдагулова. E-mail: asvetvlad@yandex.ru

Для цитирования: Соколов Д.К., Казанская Г.М., Волков А.М., Строкотова А.В., Кливер Е.Э., Григорьева Э.В., Айдагулова С.В. Гистологические и иммуногистохимические изменения префронтальной коры головного мозга мышей под действием дексаметазона. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):61–69. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.61-69.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00285.

Статья поступила 24.10.2023. Получена после рецензирования 10.11.2023. Принята в печать 01.04.2024.

Histological and immunohistochemical changes in mouse prefrontal cortex exposed to dexamethasone

D.K. Sokolov¹, G.M. Kazanskaya¹, A.M. Volkov², A.V. Strokotova¹, E.E. Kliver^{2,3}, E.V. Grigorieva¹, S.V. Aidagulova^{1,3}

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² E.N. Meshalkin National Medical Research Centre, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Abstract. *Introduction.* The effects of the synthetic glucocorticoid dexamethasone on target organs are mediated by the interaction with the glucocorticoid receptor, but the effects of the drug on the intact brain have

been poorly studied. We aimed to look at a one-time and repeated exposure to a two-dose dexamethasone on the expression of the glucocorticoid receptor and cellular changes in the prefrontal cortex over time.

Materials and methods. Male C57Bl/6 mice aged 7–8 weeks received a one-time or multiple intraperitoneal injections of dexamethasone in doses of 1.0 or 2.5 mg/kg. Structural changes in the prefrontal cortex were analyzed on paraffin sections stained by hematoxylin and eosin 90 days after the injection. The expression of the glucocorticoid receptor was studied with immunohistochemistry using monoclonal antibodies and quantitative analysis.

Results. A histological study of the prefrontal cortex exposed to a two-dose dexamethasone revealed the absence of an obvious dose dependence and the reversibility of dystrophic and hydropic changes. The most pronounced changes were revealed with a one-time administration of the drug (on day 7) and repeated administration (on day 15) while normal tissue architecture returned to that of the control groups. The expression level of the glucocorticoid receptor after a one-time dexamethasone injection at a dose of 2.5 mg/kg showed a significant growth ($p < 0.05$) on days 3 and 10 compared to that of the control group, while after multiple dexamethasone injections, the GR expression decreased on day 15, but by day 30 it returned to its initial level.

Conclusion. Stereotypical dystrophic and hydropic changes in the prefrontal cortex during exposure to two different regimens and dexamethasone doses developed on days 7 and 15. We revealed an opposite effect of 2.5 mg/kg dexamethasone administration regimens on the expression of the glucocorticoid receptor in the prefrontal cortex of mice relative to the control group: at a one-time administration the expression increased by 8.1% on day 10 and at multiple administration the expression grew by 9.9% on day 15.

Keywords: dexamethasone, glucocorticoids, brain, prefrontal cortex, glucocorticoid receptor, immunohistochemistry

Corresponding author: Svetlana V. Aidagulova. E-mail: asvetvlad@yandex.ru

For citation: Sokolov D.K., Kazanskaya G.M., Volkov A.M., Strokotova A.V., Kliver E.E., Grigorieva E.V., Aidagulova S.V. Histological and immunohistochemical changes in mouse prefrontal cortex exposed to dexamethasone. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):61–69 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.61-69.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 21-15-00285.

Received 24.10.2023. **Received in revised form** 10.11.2023. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Синтетический глюкокортикоид (ГК) дексаметазон (Dexamethasone, Dex) давно применяют в клинической практике для иммуносупрессии при аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, что влияет на качество жизни пациентов и их ментальный статус [1]. Отмечен негативный эффект препарата на развивающийся мозг и психическое здоровье детей [2]. Свои эффекты ГК опосредуют через глюкокортикоидные рецепторы (ГР), локализующиеся во всех клетках нервной системы [3], но уровень экспрессии ГР варьирует, что определяет структурную пластичность нейронов, макро- и микроглии в условиях стресса и/или влияния экзогенных ГК [4]. Кроме того, ГК модулируют содержание в нейронах головного мозга базовых молекул внеклеточного матрикса, таких как протеогликаны и гликозаминогликаны [5, 6].

Получено множество научных данных о молекулярных механизмах действия ГК на различные клетки интактного головного мозга, однако гистологические исследования сосредоточены в основном на неонатальном этапе развития мозга у грызунов, который служит моделью для тестирования эффектов применения синтетических ГК у недоношенных детей с незрелой легочной тканью. Так, по данным J.D. Jaumotte [7], Dex негативно влияет на мозг новорожденных крысят: после пяти ежедневных инъекций 0,5 мг/кг Dex на 15-е сутки наблюдается уменьшение скорости раз-

вития коры и мозжечка, а также заметное снижение экспрессии основного белка миелина в мозолистом и полосатом теле.

В другом исследовании [8] крысам на 6-й день постнатального развития внутрибрюшинно вводили Dex или гидрокортизон либо однократно, либо в течение 4–6 суток. В отличие от гидрокортизона Dex снижал прирост массы мозга и повышал активность каспазы-3, а также ухудшал способность к обучению и снижал память в ювенильном возрасте. Итак, Dex негативно воздействовал на мозг крысят [8], несмотря на то, что сравнительно низкие дозы Dex повышали содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF A) [9].

В давнем исследовании E.T. Hedley-Whyte [10] по данным световой и электронной микроскопии Dex вызывал отек мозга у интактных мышшей после одной инъекции 3 мг/кг внутримышечно или 2 мг/кг внутривенно, уменьшая проницаемость сосудов головного мозга для макромолекул.

Несмотря на большое количество и высокий уровень молекулярных, геномных и магнитно-резонансных исследований мозга [11], сохраняется актуальность изучения воздействия ГК на интактную нервную ткань ЦНС. ГК применяют при самых разных заболеваниях, при которых ткань головного мозга не является целевым органом (например, дерматиты, артрит и т.д.) и может поэтому рассматриваться как здоровая, нормальная. Тем не менее в силу системного воздействия ГК это

может иметь негативные последствия в долгосрочной перспективе. Чтобы изучить этот вопрос, мы использовали экспериментальную модель – интактных мышей и исследовали эффекты длительного (до 90 суток) воздействия дексаметазона. Цель настоящего исследования – изучить тканевые изменения префронтальной коры и динамику влияния однократного и многократного воздействия двух дозировок Dex на содержание глюкокортикоидного рецептора у мышей C57Bl/6.

Материалы и методы

Исследования проводили на 125 мышах – самцах линии C57Bl/6 с массой тела 22–30 граммов в возрасте 7–8 недель. Все процедуры с экспериментальными животными проведены в соответствии с директивой Совета Европейского сообщества 2010/63/ЕС и одобрены локальным комитетом по биомедицинской этике Института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ (протокол № 4/2017 от 23.06.2017). Животных выводили из эксперимента в ходе декапитации с использованием гильотины согласно руководству по эвтаназии животных (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011).

В эксперименте с однократным введением Dex контрольную группу (n=7) формировали животные с одной внутрибрюшинной инъекцией 0,9% раствора натрия хлорида в объеме 200 мкл. С учетом сравнительной устойчивости мелких млекопитающих однократную инъекцию препарата Dex (KRKA Pharma, Словения) животные получали в дозировках 1,0 мг/кг (n=24) или 2,5 мг/кг (n=25) [12, 13]. Сроки выведения животных из эксперимента составляли 1, 3, 7 и 10 суток.

В эксперименте с многократным введением Dex животных контрольной группы (n=7) физиологический раствор вводили в течение 10 дней. Остальным мышам (n=62) по той же схеме внутрибрюшинно вводили Dex в дозировках 1,0 мг/кг (n=34) или 2,5 мг/кг (n=28). Животных выводили из эксперимента через 15, 30, 60 и 90 суток.

Левое полушарие головного мозга мышей фиксировали в забуференном 10% растворе формалина. Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм получали на расстоянии $5 \pm 0,5$ мм от Bregma и окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). Иммуногистохимический (ИГХ) анализ проведен для оценки экспрессии ГР с помощью антител (Abcam, каталожный номер ab183127, Великобритания) в разведении 1:1000. Демаскировку антигенов проводили с помощью буфера с pH 9 (Dewax and HIER Buffer N, Thermo Scientific, США). Для визуализации продуктов реакции применяли систему детекции со вторичными антителами, мечеными диаминобензидином (Abcam, каталожный номер ab64264, Великобритания). На каждом препарате фотографировали не менее пяти неперекрывающихся полей зрения при $\times 400$. Иммуногистохимическую реакцию на ГР оценивали количественно (программа ZENblue, Zeiss, Германия):

на панели инструментов выбирали опцию Graphics и далее Rectangle aligned, позволяющую выделить на фото прямоугольник площадью 70249 ± 35 мкм². При одинаковых настройках осветительной системы микроскопа и наборах светофильтров имеющийся в опциях параметр «среднее значение интенсивности сигнала» усредняли по трем каналам (красный, зеленый и голубой) и выражали в условных единицах от 0 до 255.

Для статистической обработки результатов использовали программу MSeXcel 7.0 (Microsoft, США); после проверки на нормальность распределения по Колмогорову–Смирнову вычисляли среднее арифметическое и его ошибку (SD). Статистическую значимость высчитывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Бонферрони для определения различий между группами. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

После однократной инъекции Dex в дозировке 1,0 мг/кг умеренные гистологические изменения развивались лишь к 7-му дню эксперимента и включали в себя гиперхромность ядер нейронов наружного зернистого слоя и слабый перичеселлюлярный отек, которые редуцировались к 10-м суткам эксперимента. При введении более высокой однократной дозы Dex (2,5 мг/кг) уже на 3-и сутки появлялись клетки-«тени» – нейроны с гипохромным ядром и бледной цитоплазмой. На 7-е сутки гетерогенность клеточных элементов увеличилась за счет многочисленных нейронов с признаками ацидофилии и кариорексиса, что сопровождалось диффузным перичеселлюлярным и периваскулярным отеком. На 10-й день эксперимента дистрофические изменения нейронов характеризовались вакуолизацией ядер, но сосудистые нарушения нивелировались (рис. 1).

В целом, при однократном введении Dex в дозе 1,0 мг/кг выраженные структурные изменения префронтальной коры не выявлены, но при повышении дозировки препарата до 2,5 мг/кг отмечены очаговые изменения тинкториальных свойств ядер и цитоплазмы нейронов, соответствующие фенотипу дистрофии и сопровождающиеся обратимым перичеселлюлярным и периваскулярным отеком.

При многократном введении Dex дозировка 1,0 мг/кг на 15-е сутки эксперимента индуцировала мозаичность структурных изменений нейронов и в разной степени выраженный очаговый или диффузный периваскулярный и перичеселлюлярный отек (рис. 2). В большинстве нейронов ядра гиперхромны, в эухромных ядрах заметны вакуоли при отсутствии ядрышек.

У мышей, получавших многократные инъекции Dex в дозировке 1,0 мг/кг, на 30-е сутки эксперимента явления перичеселлюлярного и периваскулярного отека заметно редуцировались при сохранении мозаичности тинкториальных свойств цитоплазмы и ядер нейронов. При этом в наружном зернистом слое коры сохранялись скопления гиперхромных клеток с перичеселлюлярным отеком.

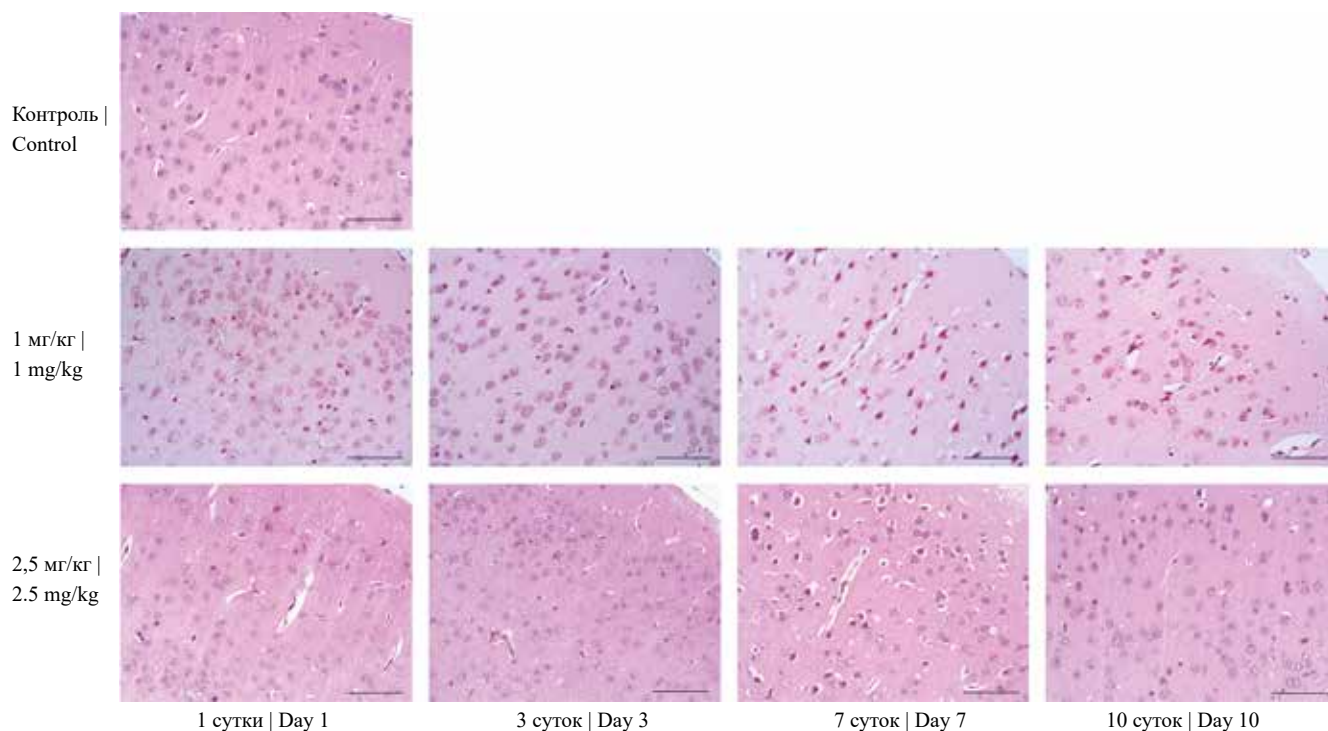


Рис. 1. Гистологические особенности префронтальной коры мышей C57Bl/6 при однократном воздействии двух доз дексаметазона в динамике эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. Бар 50 мкм

Fig. 1. Histological features of the prefrontal cortex of C57Bl/6 mice after a one-time exposure to a two-dose dexamethasone over time. H&E stain, $\times 400$. Bar 50 μm

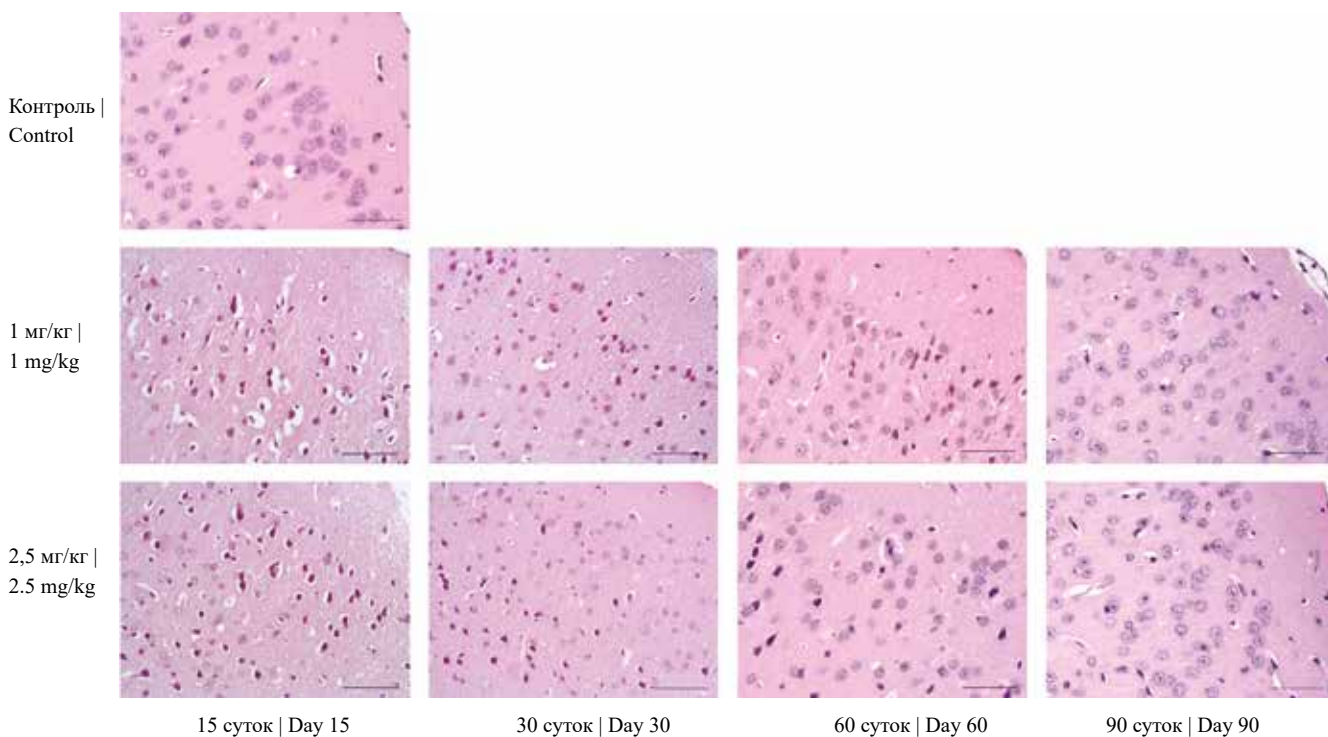


Рис. 2. Гистологические особенности префронтальной коры мышей C57Bl/6 при многократном воздействии двух доз дексаметазона в динамике эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. Бар 50 мкм

Fig. 2. Histological features of the prefrontal cortex of C57Bl/6 mice after repeated exposure to a two-dose dexamethasone over time. H&E stain, $\times 400$. Bar 50 μm

Через 60 суток после многократного введения Dex в дозе 1,0 мг/кг гистологические особенности сопоставимы с таковыми у животных контрольной группы, за исключением очагового слабо выраженного периваскулярного отека, и по сравнению с предыдущим сроком эксперимента с неполным восстановлением нейронов – с ацидофилией цитоплазмы и ядер, что вносило мозаичность в цитоархитектонику.

На 90-е сутки после многократного введения Dex в дозе 1,0 мг/кг в коре головного мозга мышей признаки сосудистых изменений и отека отсутствовали, и лишь у отдельных животных был отмечен слабый перикапиллярный отек. Тинкториальные свойства ядер и цитоплазмы нейронов не отличались от таковых в клетках контрольной группы, и большинство ядер содержало ядрышки.

После многократного введения Dex в дозировке 2,5 мг/кг на 15-е сутки эксперимента в префронтальной коре мышей отмечались мозаичные структурные изменения, аналогичные обнаруженным в группе с меньшей дозировкой Dex (рис. 2): варьирующие по тинкториальным свойствам цитоплазмы и ядер нейроны с перичеселлюлярным отеком на фоне очагового периваскулярного отека.

На 30-е сутки гистологические особенности неокортекса не имели принципиальных отличий от изменений, наблюдаемых в аналогичные сроки эксперимента у мышей, получавших дозу Dex 1,0 мг/кг. Незначительные отличия были связаны лишь с большей выраженностью перинуклеарного отека в некоторых нейронах.

Через 60 суток после многократного введения Dex в дозе 2,5 мг/кг у некоторых мышей отмечены одиночные гиперхромные клетки среди пирамидных нейронов в сочетании со слабым перичеселлюлярным отеком; имел место также очаговый периваскулярный отек. На 90-е сутки гистологическая картина была идентична той, которую наблюдали в аналогичные сроки эксперимента у мышей, получавших дозу Dex 1,0 мг/кг, и в целом не отличалась от таковой у животных контрольной группы.

Таким образом, при многократном введении Dex в дозе 1,0 мг/кг гистологическое исследование выявило дистрофию нейронов и явления отека, наиболее выраженные на 15-е сутки и нивелируемые к окончанию эксперимента. Дозировка препарата 2,5 мг/кг при длительном введении индуцировала аналогичные обратимые очаговые изменения тинкториальных свойств ядер и цитоплазмы нейронов, расцениваемые как дистрофические, в сочетании с перичеселлюлярным и периваскулярным отеком, которые наиболее выражены на 15-е сутки эксперимента.

В целом, гистологическое исследование префронтальной коры мышей C57Bl/6

в динамике воздействия двух дозировок Dex выявило отсутствие явной дозовой зависимости и обратимость дистрофических и гидропических изменений, наиболее выраженных при однократном введении Dex, на 7-е сутки, а при многократном на 15-е сутки эксперимента, с возвращением к исходной тканевой архитектонике, соответствующей архитектонике контрольных групп.

Далее исследовано влияние Dex на содержание ГР. После однократной инъекции Dex в дозе 1,0 мг/кг статистически значимые изменения в содержании ГР отсутствовали во все сроки эксперимента. При этом в группе мышей, получавших однократно 2,5 мг/кг Dex, оно было увеличено на 3-и сутки эксперимента (на 7,2%) и 10-е (на 8,1%) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). При этом на 7-е сутки после инъекции Dex отмечено статистически значимое уменьшение (на 6,2 и 7,5%) ($p < 0,05$) содержания ГР относительно 3-х и 10-х суток эксперимента (рис. 3, табл.), что соответствовало наиболее выраженной дистрофии нейронов в сочетании с явлениями перичеселлюлярного отека на 7-е сутки (рис. 1).

После многократных инъекций Dex в дозе 1,0 мг/кг по сравнению с животными контрольной группы в префронтальной коре животных не выявлены статистически значимые изменения содержания ГР во все сроки эксперимента (рис. 4, табл.). Повышение дозировки Dex до 2,5 мг/кг на 15-е сутки эксперимента сопровождалось его уменьшением (на 9,9%) ($p < 0,05$) по сравнению с этим показателем в контрольной группе, что, как и в эксперименте с однократным введением Dex в этой же дозе, совпало с наибольшей выраженностью дистрофических изменений нейронов и отека (рис. 2). Однако на 30-е сутки содержание ГР увеличивалось относительно 15-х суток на 15,9% и возвращалось к по-

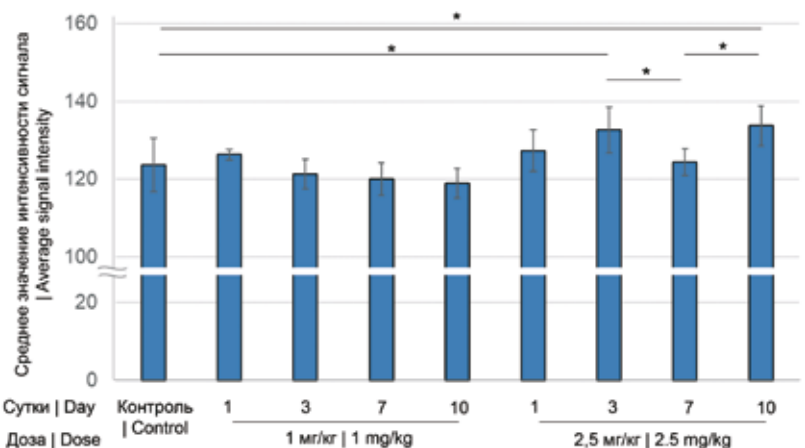


Рис. 3. Динамика содержания глюкокортикоидного рецептора в префронтальной коре мышей C57Bl/6 в условиях однократного введения Dex в дозировках 1,0 или 2,5 мг/кг. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. * – $p < 0,05$

Fig. 3. Glucocorticoid receptor content in the prefrontal cortex of C57Bl/6 mice exposed to a one-time injection of Dex at dosages of 1.0 or 2.5 mg/kg over time. Control – mice treated with saline solution. * – $p < 0.05$

Содержание ГР в коре больших полушарий мозга мышей при кратко- и долгосрочном введении двух дозировок дексаметазона | Glucocorticoid receptor expression in the cerebral cortex of mice after short- and long-term administration of dexamethasone in two-dose regimens

Краткосрочное введение дексаметазона Short-term dexamethasone administration	Срок эксперимента, дни Experiment duration, days	Содержание глюкокортикоидного рецептора, показатель Glucocorticoid receptor content index	Долгосрочное введение дексаметазона Long-term dexamethasone administration	Срок эксперимента, дни Experiment duration, days	Содержание глюкокортикоидного рецептора, показатель Glucocorticoid receptor content index
Контроль Control		123,71±6,84	Контроль Control		115,17±7,95
Доза 1 мг/кг Dose 1 mg/kg	1	126,35±1,39	Доза 1 мг/кг Dose 1 mg/kg	15	109,86±9,62
	3	121,32±3,81		30	111,73±11,35
	7	120,12±4,21		60	108,75±5,06
	10	119,03±3,80		90	117,92±6,89
Доза 2,5 мг/кг Dose 2.5 mg/kg	1	127,38±5,37	Доза 2,5 мг/кг Dose 2.5 mg/kg	15	103,65±4,26**
	3	132,65±5,82*		30	120,17±8,30
	7	124,37±3,41		60	116,58±5,27
	10	133,75±5,09*		90	119,65±5,65

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в краткосрочном эксперименте; ** – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в долгосрочном эксперименте

* – $p < 0.05$ compared to the control group during the short-term experiment; ** – $p < 0.05$ compared to the control group during the long-term experiment

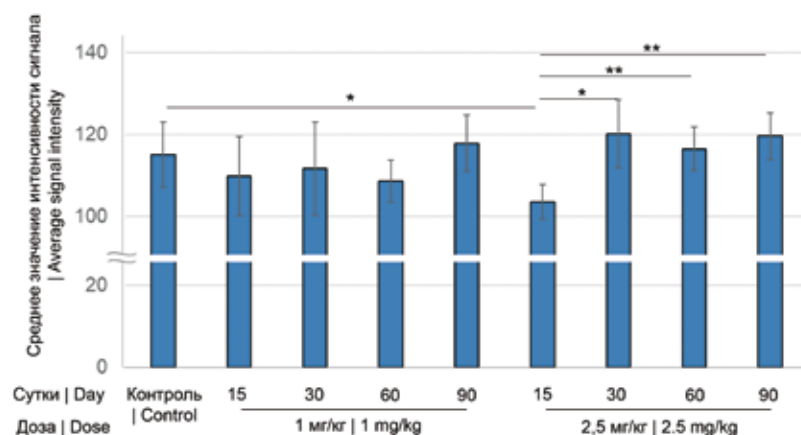


Рис. 4. Динамика содержания глюкокортикоидного рецептора в коре головного мозга мышей C57Bl/6 при воздействии многократного введения Dex в дозировках 1,0 или 2,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 15-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Fig. 4. Glucocorticoid receptor content in the prefrontal cortex of C57Bl/6 mice exposed to repeated administration of 1.0 or 2.5 mg/kg Dex over time. Animals were removed from the experiment on days 15, 30, 60, and 90. Control – mice treated with saline solution. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$

казателям контрольной группы, сохраняясь таковым на 60-е и 90-е сутки эксперимента.

Таким образом, многократное воздействие Dex оказывало более выраженный эффект на гистологию

префронтальной коры. Выявлено кратковременное влияние на содержание ГР и лишь в более высокой дозировке препарата. При однократном введении Dex в дозе 2,5 мг/кг показатель содержания ГР статистически значимо возрастал на 3-и и 10-и сутки относительно контроля, тогда как после многократных инъекций Dex содержание ГР уменьшалось относительно контрольной группы на 15-е сутки эксперимента, но к 30-м суткам возвращалось на исходный уровень.

Обсуждение

Для уточнения гистологических изменений префронтальной коры при воздействии Dex нами было проведено экспериментальное исследование однократного и многократного эффекта двух дозировок Dex, часто применяемых в клинике. Как известно, при лечении ряда заболеваний нервной системы ГК широко применяют как противоотечное и противовоспалительное средство, например при рассеянном склерозе, травмах и опухолях головного и спинного мозга, несмотря на отсутствие четких показаний и фармакологических стратегий [14–17]. Dex широко используют для лечения пациентов с отеком

головного и спинного мозга, в том числе перитуморальным отеком при глиобластоме, из-за его мощного глюкокортикоидного и минимального минералокортикоидного эффекта. Тем не менее оптимальная доза Dex для лечения или профилактики радиационных повреждений головного мозга не определена [18]. Кроме того, использование ГК может фактически ухудшить исходы, поскольку эффективность препарата непредсказуема в конкретной клинической ситуации и варьирует, поэтому для достижения клинически значимого снижения отека применяют высокие дозы Dex, которые приводят к тяжелым системным побочным эффектам и резистентности к препарату, особенно при длительном применении [19, 20].

Классификация отеков нервной ткани основана на морфологическом профиле распределения жидкости: внутриклеточный (цитотоксический) отек нейронов и внеклеточный (вазогенный) отек, обусловленный повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера с гидратацией внеклеточного матрикса [16]. В нашей работе выявлены признаки независимого от дозы и сравнительно слабо выраженного цитотоксического и вазогенного отека префронтальной коры, которые были редуцированы в течение месяца даже при многократном воздействии Dex в дозе 2,5 мг/кг.

Относительно отмеченной нами дистрофии нейронов можно заметить, что Dex оказывает системный эффект, по-разному проявляющийся в разных тканях в зависимости от дозы и длительности воздействия. ГК известны своим катаболическим эффектом на клетки и подавлением синтеза белков, поэтому, видимо, применение Dex в сочетании с токсичными препаратами способно уменьшить, в частности, гепатотоксичность антивирусного препарата ремдесивир [21].

По-видимому, воздействие препарата в относительно низких дозах не вызывает существенных структурных изменений тканей-мишеней. Например, при неспецифическом воспалении легких оптимальная доза и продолжительность терапии ГК подбираются эмпирически в зависимости от индивидуального практического опыта врача. При отсутствии дыхательной недостаточности, которую обычно лечат импульсными дозами стероидов, разумную начальную дозу преднизолона в размере 0,5–1 мг/кг идеальной массы тела (до 60 мг/день) рекомендовано поддерживать в течение 1 месяца [22, 23].

В целом, данные об эффектах ГК в условиях нормы и патологии противоречивы, и результаты исследований *in vitro* могут не совпадать с клиническими данными, поскольку выраженность положительных и отрицательных эффектов ГК определяется дозой, длительностью воздействия и тканевой специфичностью, которая зависит в том числе от уровня экспрессии ГР в различных отделах мозга [24].

В результате исследования нами выявлен противоположный эффект двух режимов введения Dex в дозе 2,5 мг/кг на показатель содержания ГР в префронтальной коре мышей: при однократном введении на

10-е сутки он возрастал на 8,1%, а при многократном уменьшался на 15-е сутки на 9,9% относительно показателя контрольной группы. Следует также отметить, что к окончанию эксперимента на 90-е сутки Dex оказывал кратковременное влияние на содержание ГР и лишь в более высокой дозировке препарата.

Ранее был изучен краткосрочный (до 10 суток) эффект однократного введения четырех различных доз Dex (0,1; 1,0; 2,5 и 10 мг/кг) на экспрессию ГР, коровых белков протеогликанов и ферментов биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата в головном мозге мышц. Показано кратковременное влияние Dex с возвращением экспрессии генов к исходному уровню, однако оно значительно повышало содержание гликозаминогликанов в матриксе головного мозга [25].

В нашей работе экспрессия ГР имела место почти в 100% нейронов с небольшими различиями интенсивности ИГХ реакции, что подчеркивает важную роль кортикостероидов для мозга. Как натуральные ГК (кортизол, гидрокортизон), так и синтетические (Dex, бета-метазон) могут проникать через гематоэнцефалический барьер. При введении даже в невысоких дозах молекула Dex не расщепляется и продолжает стимулировать ГР в большей степени, чем кортизол [2].

Заключение

Гистологическое исследование префронтальной коры мышей C57Bl/6 в динамике воздействия двух дозировок дексаметазона выявило отсутствие явной дозовой зависимости, умеренную выраженность и обратимость дистрофических и гидропических изменений префронтальной коры, наиболее выраженных при однократном введении препарата на 7-е сутки, а при многократном на 15-е сутки эксперимента, с возвращением к исходной тканевой архитектонике, соответствующей таковой в контрольных группах. Колебания содержания глюкокортикоидных рецепторов синхронизируются с переходящими гистологическими изменениями префронтальной коры, что, на наш взгляд, свидетельствует об относительной безопасности для головного мозга применения дексаметазона в дозах 1,0 и 2,5 мг/кг в широкой клинической практике.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Э.В. Григорьева.
Сбор и обработка материала – Д.К. Соколов, Г.М. Казанская, А.М. Волков, А.В. Строкотова, Е.Э. Кливер, С.В. Айдагулова.
Написание текста – С.В. Айдагулова, Г.М. Казанская.
Редактирование – Э.В. Григорьева, А.М. Волков.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.V. Grigorieva.
Collected the data and performed the analysis – D.K. Sokolov, G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov, A.V. Strokotova, E.E. Kliver, S.V. Aidagulova.
Wrote the paper – S.V. Aidagulova, G.M. Kazanskaya.
Edited the manuscript – E.V. Grigorieva, A.M. Volkov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Deploey N, Van Moortel L, Rogatsky I, Peelman F, De Bosscher K.* The biologist's guide to the glucocorticoid receptor's structure. *Cells.* 2023;12(12):1636. DOI: 10.3390/cells12121636.
2. *Malaeb SN, Stonestreet BS.* Steroids and injury to the developing brain: net harm or net benefit? *Clin Perinatol.* 2014;41(1):191–208. DOI: 10.1016/j.clp.2013.09.006.
3. *Meijer OC, Buurstedde JC, Viho EMG, Amaya JM, Koning ACAM, van der Meulen M et al.* Transcriptional glucocorticoid effects in the brain: finding the relevant target genes. *J Neuroendocrinol.* 2023;35(2):e13213. DOI: 10.1111/jne.13213.
4. *Madalena KM, Lerch JK.* The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity. *Neural Plast.* 2017;2017:8640970. DOI: 10.1155/2017/8640970.
5. *Tsidulko AY, Bezier C, de la Bourdonnaye G, Suhovskih AV, Pankova TM, Kazanskaya GM et al.* Conventional anti-glioblastoma chemotherapy affects proteoglycan composition of brain extracellular matrix in rat experimental model *in vivo*. *Front Pharmacol.* 2018;9:1104. DOI: 10.3389/fphar.2018.01104.
6. *Strokotova AV, Grigorieva EV.* Glucocorticoid effects on proteoglycans and glycosaminoglycans. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15678. DOI: 10.3390/ijms232415678.
7. *Jaumotte JD, Franks AL, Bargerstock EM, Kisanga EP, Menden HL, Ghersi A et al.* Ciclesonide activates glucocorticoid signaling in neonatal rat lung but does not trigger adverse effects in the cortex and cerebellum. *Neurobiol Dis.* 2021;156:105422. DOI: 10.1016/j.nbd.2021.105422.
8. *Feng Y, Kumar P, Wang J, Bhatt AJ.* Dexamethasone but not the equivalent doses of hydrocortisone induces neurotoxicity in neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 2015;77(5):618–24. DOI: 10.1038/pr.2015.19.
9. *Feng Y, Rhodes PG, Liu H, Bhatt AJ.* Dexamethasone induces neurodegeneration but also up-regulates vascular endothelial growth factor A in neonatal rat brains. *Neuroscience.* 2009;158(2):823–32. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.024.
10. *Hedley-Whyte ET, Hsu DW.* Effect of dexamethasone on blood-brain barrier in the normal mouse. *Ann Neurol.* 1986;19(4):373–7. DOI: 10.1002/ana.410190411.
11. *Процина А.Е., Харламова А.С., Кривова Ю.С., Савельев С.В.* Современные тенденции картирования головного мозга. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(1):15–23. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.15-23.
Proshchina AE, Kharlamova AS, Krivova YuS, Saveliev SV. Modern trends in brain mapping and atlas. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):15–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.15-23.
12. *Yao YY, Liu DM, Xu DF, Li WP.* Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;574(1):20–8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.07.021.
13. *Drakulić D, Veličković N, Stanojlović M, Grković I, Mitrović N, Lavrnja I et al.* Low-dose dexamethasone treatment promotes the pro-survival signaling pathway in the adult rat prefrontal cortex. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(7):605–16. DOI: 10.1111/jne.12037.
14. *Michinaga S, Koyama Y.* Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):9949–75. DOI: 10.3390/ijms16059949.
15. *Dos Santos N, Novaes LS, Dragunas G, Rodrigues JR, Brandão W, Camarini R et al.* High dose of dexamethasone protects against EAE-induced motor deficits but impairs learning/memory in C57BL/6 mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):6673. DOI: 10.1038/s41598-019-43217-3.
16. *Cook AM, Morgan Jones G, Hawryluk GWJ, Mailloux P, McLaughlin D, Papangelou A et al.* Guidelines for the acute treatment of cerebral edema in neurocritical care patients. *Neurocrit Care.* 2020;32(3):647–66. DOI: 10.1007/s12028-020-00959-7.
17. *Seblani M, Decherchi P, Brezun JM.* Edema after CNS trauma: a focus on spinal cord injury. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7159. DOI: 10.3390/ijms24087159.
18. *Tada E, Matsumoto K, Kinoshita K, Furuta T, Ohmoto T.* The protective effect of dexamethasone against radiation damage induced by interstitial irradiation in normal monkey brain. *Neurosurgery.* 1997;41(1):209–19. DOI: 10.1097/00006123-199707000-00033.
19. *Murayi R, Chittiboyna P.* Glucocorticoids in the management of peritumoral brain edema: a review of molecular mechanisms. *Childs Nerv Syst.* 2016;32(12):2293–302. DOI: 10.1007/s00381-016-3240-x.
20. *Spies LL, Verhoog NJD, Louw A.* Acquired glucocorticoid resistance due to homologous glucocorticoid receptor downregulation: a modern look at an age-old problem. *Cells.* 2021;10(10):2529. DOI: 10.3390/cells10102529.
21. *Liu K, Stern S, Heil EL, Li L, Khairi R, Heyward S et al.* Dexamethasone mitigates remdesivir-induced liver toxicity in human primary hepatocytes and COVID-19 patients. *Hepatol Commun.* 2023;7(3):e0034. DOI: 10.1097/HC9.0000000000000034.
22. *Hauber HP, Bittmann I, Kirsten D.* Non-specific interstitial pneumonia (NSIP). *Pneumologie.* 2011;65(8):477–83. DOI: 10.1055/s-0030-1256284.
23. *Amratia DA, Viola H, Ioachimescu OC.* Glucocorticoid therapy in respiratory illness: bench to bedside. *J Investig Med.* 2022;70(8):1662–80. DOI: 10.1136/jim-2021-002161.
24. *Егорова А.В., Воронков Д.Н., Федорова Е.Н., Баранич Т.И., Глинкина В.В., Сухоруков В.С.* Особенности строения и функции митохондрий в нейронах и глиоцитах различных отделов головного мозга лабораторных грызунов. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(2):5–13. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
Egorova AV, Voronkov DN, Fedorova EN, Baranich TI, Glinkina VV, Sukhorukov VS. Structural and functional features of mitochondria in neurons and gliocytes of various cerebral regions of laboratory rodents. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(2):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.5-13.
25. *Аладьев С.Д., Соколов Д.К., Строкотова А.В., Казанская Г.М., Волков А.М., Политко М.О. и др.* Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей. Успехи молекулярной онкологии. 2023;10(1):25–39. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39.
Aladev SD, Sokolov DK, Strokotova AV, Kazanskaya GM, Volkov AM, Politko MO et al. Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):25–39 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39.

Информация об авторах

Дмитрий Константинович Соколов – младший научный сотрудник лаборатории гликобиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Галина Михайловна Казанская – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории гликобиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Александр Михайлович Волков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Анастасия Владимировна Строкотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории гликобиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Евгений Эдуардович Кливер – доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, профессор кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета.

Эльвира Витальевна Григорьева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией гликобиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ.

Светлана Владимировна Айдагулова – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории гликобиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета.

Author information

Dmitry K. Sokolov – Junior Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0002-4145-5277>

Galina M. Kazanskaya – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0003-2598-1805>

Alexander M. Volkov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, E.N. Meshalkin National Medical Research Center.

<https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>

Anastasia V. Strokotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>

Evgenii E. Kliver – Dr. Sci. (Med.), Head of Pathology Department, E.N. Meshalkin National Medical Research Center; Professor, Pathological Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>

Elvira V. Grigorieva – Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine.

<https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

Svetlana V. Aidagulova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Glycobiology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Head of the Laboratory of Cellular Biology and Fundamentals of Reproduction, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-7124-1969>

Оценка экспрессии эндотелиальных и некоторых маркеров воспаления в экспериментальной модели острого респираторного дистресс-синдрома

Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина, А.А. Сапрыкина, Я.А. Гущин, М.Н. Макарова

АО Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», Кузьмоловский Ленинградской области, Россия

Резюме. Введение. Цитокины играют важную роль в качестве сигнальных молекул, которые инициируют, усиливают и закрепляют воспалительную реакцию в патогенезе острого респираторного дистресс-синдрома. Цели исследования – в рамках модели на крысах выявить наиболее показательные для описанной патологии иммуногистохимические маркеры и области их исследования, установить оптимальный возраст животных для индукции острого респираторного дистресс-синдрома.

Материалы и методы. Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование срезов легких крыс интактных групп и групп с липополисахарид-индуцированной моделью патологии в трех областях – слизистой оболочки бронхов, консолидации легкого и неизменной паренхимы. И интактная группа, и группа с моделью патологии были представлены в двух возрастных категориях. Сравнивали микроскопическую картину, количество бокаловидных клеток, выраженность иммуногистохимической реакции на IL-1 β , IL-6, TNF- α , Ki-67 и CD31.

Результаты. В обеих группах с моделированием патологии установлено заметное увеличение количества бокаловидных клеток. Базальные уровни IL-1 β и пролиферативная активность в легких возрастают к 8–10-недельному возрасту по сравнению с возрастом 4–6 недель, а площадь капиллярной сети, напротив, снижается. В группе со сформированной патологией наблюдали возрастание уровня IL-1 β у животных в возрасте 4–6 недель во всех исследуемых областях, а у животных в возрасте 8–10 недель только в области неизменной паренхимы. Относительная плотность капиллярной сети легких снизилась в группе с моделированием патологии в возрасте 4–6 недель.

Заключение. В качестве иммуногистохимических маркеров выраженности острого респираторного дистресс-синдрома на 4-й день развития патологии можно рекомендовать IL-1 β как воспалительный цитокин и CD31 как эндотелиальный маркер, отражающий изменения плотности сосудистой сети. Возраст животных 4–6 недель в ходе этого исследования оказался более стабильным в отношении изменения маркеров и, на наш взгляд, является предпочтительным.

Ключевые слова: IL-1 β , TNF- α , Ki-67, CD31, респираторный дистресс-синдром, липополисахарид, легкие

Для корреспонденции: Жанна Юрьевна Устенко. E-mail: ustenko.ju@doclinika.ru

Для цитирования: Устенко Ж.Ю., Савватейкина А.И., Сапрыкина А.А., Гущин Я.А., Макарова М.Н. Оценка экспрессии эндотелиальных и некоторых маркеров воспаления в экспериментальной модели острого респираторного дистресс-синдрома. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):70–78. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.3.70-78.

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Статья поступила 17.01.2024. Получена после рецензирования 01.03.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Evaluation of the expression of endothelial and some inflammation markers in an experimental acute respiratory distress syndrome model

Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina, A.A. Saprykina, Ya.A. Gushchin, M.N. Makarova

Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" JSC, Kuzmolovsky, Leningrad oblast, Russia

Abstract. Introduction. In the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS), signaling molecules such as cytokines play an important role in initiating, enhancing, and consolidating the inflammatory response. We aimed to identify the most indicative immunohistochemical markers for ARDS and the areas of studying them and to establish the optimal age of animals (i.e., rats) for ARDS induction.

Materials and methods. We conducted a histological and immunohistochemical study of rats' lung sections in two intact groups and two groups with a lipopolysaccharide-induced model of ARDS in three areas: bronchial epithelium, lung consolidation, and unchanged parenchyma. The rats were also divided into two age groups. We compared a microscopic appearance, the number of goblet cells, and immunohistochemical expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , Ki-67, and CD31.

Results. Both groups saw a significant increase in the number of goblet cells. At 8–10 weeks of age, the rats developed increased basal levels of IL-1 β and proliferative activity in the lungs; the area of the capillary network decreased. In the experimental groups, the animals aged 4–6 weeks showed an increase in the level of IL-1 β in all lung areas; however, in the animals aged 8–10 weeks, we observed this growth only in the area of unchanged parenchyma. The relative density of the capillary lung network decreased in the ARDS group aged 4–6 weeks.

Conclusion. We would recommend IL-1 β as an inflammatory cytokine and CD31 as endothelial marker, which reflects changes in vascular density, as immunohistochemical markers of ARDS severity on day 4 of its development. Marker changes are more stable in the 4–6-week-old animals.

Keywords: IL-1b, TNF- α , Ki-67, CD31, respiratory distress syndrome, lipopolysaccharide, lung

Corresponding author: Zhanna Yu. Ustenko. E-mail: ustenko.ju@doclinika.ru

For citation: Ustenko Zh. Yu., Savvateikina A.I., Saprykina A.A., Gushchin Ya.A., Makarova M.N. Evaluation of the expression of endothelial and some inflammation markers in an experimental acute respiratory distress syndrome model. *Clin. exp. morphology.* 2024;13(3):70–78 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.70-78.

Funding. The study was carried out without sponsorship.

Received 17.01.2024. **Received in revised form** 01.03.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – это синдром дыхательной недостаточности, в основе которого лежит остро возникающее диффузное воспалительное поражение легких, развивающееся как неспецифическая реакция на различные прямые и системные повреждающие факторы [1, 2]. ОРДС характеризуется острой экссудативной фазой, сочетающей диффузное повреждение альвеол и отек легких, за которой следует более поздняя фибропролиферативная фаза.

Во время острой экссудативной фазы происходит активация моноцитов и макрофагов. Эта активация стимулирует высвобождение первой волны цитокинового сигнала: фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β). Эти ключевые цитокины воздействуют на лейкоциты и иные типы клеток, инициируют каскад вторичных цитокинов и высвобождают другие растворимые медиаторы [3]. Активация нейтрофилов приводит к повреждению эндотелия капилляров и эпителии альвеол. В результате трансудат проникает в легочную паренхиму и альвеолярное пространство, что приводит к нарушению газообмена. Последующее разведение сурфактантных белков вызывает альвеолярный коллапс и снижение эластичности легких.

При прогрессировании патологического процесса начинает развиваться фибропролиферативная фаза, характеризующаяся диффузным фиброзом и облитерацией альвеолярных пространств [4].

Важную роль в патогенезе ОРДС играют цитокины. Двумя наиболее важными цитокинами раннего реагирования являются TNF- α и IL-1 β [5]. TNF α стимулирует хемотаксис, активацию нейтрофилов, индуцирует апоптоз, способствует развитию отека. IL-1 β индуцирует рекрутирование и активацию нейтрофи-

лов, увеличивает проницаемость сосудов [6, 7]. Еще один важный цитокин, IL-6, продуцируется широким спектром клеток в ответ на стимуляцию эндотоксинами, IL-1 β , TNF- α . Он имеет решающее значение для дифференцировки цитотоксических Т-клеток, функции макрофагов, продукции белков острой фазы [6]. Также важную роль в развитии ОРДС играет реакция эндотелиальных клеток на высвободившиеся цитокины [8, 9].

Мы в своей работе изучали выраженность иммуногистохимической реакции на воспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α , маркера эндотелиальных клеток CD31 и пролиферативного маркера Ki-67 в тканях интактных крыс и крыс со сформированным ОРДС разного возраста.

Цель исследования – установить оптимальный возраст животных для индукции ОРДС и локализацию изменений иммуногистохимической реакции на IL-1 β , IL-6, TNF- α , CD31 и Ki-67.

Материалы и методы

В исследовании использовали самок крыс Вистар двух возрастных групп – 4–6 недель ($n=20$) и 8–10 недель ($n=20$) (питомник НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). В каждой возрастной группе животных распределяли по 10 голов в интактную группу и в группу, у которой моделировали ОРДС (табл. 1). Расчет объема выборки проведен на основании метода уравнения ресурсов [10].

Животных содержали в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Данное исследование было рассмотрено биоэтической комиссией НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и одобрено для проведения биоэтической комиссией (БЭК 1.17/22 от 29.04.2022).

Характеристика экспериментальных групп | Description of the experimental groups

Номер группы Group number	Возраст, группа Age, group	Число животных в группе Number of animals in the group	Масса животных, г Animals' weight, g	Исследуемые объекты Studied objects	Доза ЛПС, мг/кг LPS dose, mg/kg
1	4–6 недель, контроль 4–6 weeks, control	10	100–150	–	0
2	8–10 недель, контроль 8–10 weeks, control	10	200–260		
3	4–6 недель, ОРДС 4–6 weeks, ARDS	10	100–150	Индуктор патологии ЛПС ARDS inducer	15
4	8–10 недель, ОРДС 8–10 weeks, ARDS	10	200–260		

Животным, входящим в группы с модельной патологией ОРДС, вводили индуктор патологии липополисахарид (ЛПС), выделенный из *E. coli* штамм O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), однократно эндотрахеально в объеме 2 мл/кг, приготовленный в физиологическом растворе, без применения наркоза. Животные интактной группы индуктор патологии не получали.

Все животные были выведены из эксперимента на 4-й день (72 часа после введения индуктора патологии). Вывод из эксперимента осуществлялся посредством введения пропофола в дозе 60–80 мг/кг с последующим извлечением легких для патоморфологического исследования.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования отобранные образцы легких фиксировали в 10% формалине и подвергали стандартной гистологической проводке. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм. Срезы для гистологического и гистохимического исследования депарафинизировали, затем промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином и эозином, а также альциановым синим.

Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к IL-1 β в разведении 1:100 (Abcam, США) и кроличьи моноклональные антитела к IL-6 в разведении 1:200 (Huabio, Китай) с экспозицией 1 час, кроличьи поликлональные антитела к Ki-67 в разведении 1:750 (Abcam, США) с экспозицией 1,5 часа, кроличьи поликлональные антитела к TNF- α (MyBioSource, США) в разведении 1:150, кроличьи моноклональные антитела к CD31 в разведении 1:1000 (Abcam, США) с экспозицией 2 часа. В качестве системы визуализации для первичных антител была использована полимерная система детекции PrimeVision («ПраймБиоМед», Россия). Для маркеров CD31 и Ki-67 проводили докрасивание в гематоксилине в течение 10 секунд для дальнейшей визуализации ядер.

Специфичность окрашивания предварительно проверяли, окрашивая контрольные ткани. Для IL-1 β и IL-6

в качестве контрольной ткани использовали срез лимфатического узла крысы (лимфоидные клетки – положительный контроль антигена, клетки эндотелия и капсулы лимфоузла – отрицательный контроль антигена). Для TNF- α в качестве контрольной ткани использовали срез легкого крысы (лимфоидные клетки – положительный контроль антигена, эндотелиоциты – отрицательный контроль антигена). Для Ki-67 в качестве контрольной ткани использовали срез аденокарциномы молочной железы человека (опухолевые клетки – положительный контроль антигена) и печени крысы (гепатоциты – отрицательный контроль антигена). Для CD-31 в качестве контрольной ткани использовали срез почки крысы (эндотелиоциты клубочков – положительный контроль антигена, соединительная ткань капсулы почки – отрицательный контроль антигена). Все используемые нами антитела продемонстрировали специфичное окрашивание на соответствующих тканях. Наряду с этим для каждой окраски делали дополнительный срез легкого с экспериментального блока для постановки отрицательного контроля реагентов.

Морфологический анализ проводили при помощи светооптического микроскопа «Микромед-3» (U3) (Россия) при $\times 50$, $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TOUPCAM UCMOS05100KPA (ToupTek, КНР) и программного обеспечения ToupView 3.7.7892.

При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили оценку микроскопических изменений и устанавливали факт развития ОРДС. Также проводили количественную оценку бокаловидных клеток в бронхах среднего калибра на стеклах, окрашенных альциановым синим.

Для маркеров TNF- α , IL-1 β морфометрический анализ осуществляли в трех областях – слизистой оболочки бронхов, очагов консолидации легкого и неизменной паренхимы легкого на периферии очага консолидации. Подсчет вели в трех полях зрения для каждой области при $\times 400$. Среднее из трех значений было представлено как количественные данные образца.

Подсчитывали процент площади положительно окрашенной ткани относительно всей площади ткани в полях зрения путем деления числа положительно окрашенных пикселей на общее число пикселей, содержащихся в образце ткани. Полученные данные рассматривали как количественное отражение концентрации цитокина в исследуемой области. Вычисление числа пикселей проводили на микрофотографиях выбранных полей с использованием программного обеспечения QuPath-0.3.2.

Для маркеров CD31 и Ki-67 морфометрический анализ осуществлялся в случайно выбранных областях. Подсчет вели в пяти полях зрения при $\times 400$.

Для Ki-67 вычисляли индекс пролиферации по следующей формуле:

$$I_{\text{Ki-67}} = \frac{N^+}{S} \times 1\,000\,000,$$

где $I_{\text{Ki-67}}$ – индекс пролиферации, N^+ – количество положительно окрашенных на Ki-67 клеток, S – общая площадь ткани в поле зрения, выраженная в пикселях.

Индекс умножали на 1 000 000 для удобства представления данных. Количество положительно окрашенных клеток считали вручную. Для маркера CD31 считали процент площади капиллярной сети относительно площади ткани путем деления числа положительно окрашенных пикселей на общее число пикселей, содержащихся в образце.

Данные о содержании IL-6 исключены из исследования вследствие технической ошибки при проведении иммуногистохимической реакции на некоторых стеклах и как следствие невозможности получения полных данных от всех животных.

Данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). При несоответствии данных закону нормального распределения рассчитывали медиану (Me) и квартильный размах ($Q1$; $Q3$).

Для оценки независимых данных с признаками нормального распределения (количество бокаловидных клеток) использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). В случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора последующие межгрупповые сравнения (post hoc analysis) проводили с использованием критерия Тьюки.

Для анализа данных, не подчиняющихся закону нормального распределения (уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β , TNF- α , Ki-67 и CD31), использовали критерий Манна–Уитни, сравнивая попарно группы 1 и 3 и группы 2 и 4. Различия определяли при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad-Prism 9.1.1.

Результаты

При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и альциановым синим, установлен факт формирования патологии на основании обнаружения следующих признаков в группах с моделированием ОРДС (группы 3 и 4): очаги умеренной и выраженной лейкоцитарной, преимущественно нейтрофильной, инфильтрации, скопление нейтрофильных гранулоцитов в просвете средних и крупных бронхов, очаги некроза, наличие гиалиновых мембран (рис. 1 А). Также наблюдались признаки отека, кровоизлияний и очаги консолидации (ателектаза) легких. Три последних признака выявили и в контрольной группе, в менее выраженной степени.

При исследовании срезов, окрашенных альциановым синим, установлено заметное увеличение количества бокаловидных клеток в группах с моделированием ОРДС (табл. 2). Возрастные отличия в количестве бокаловидных клеток не выявлены.

При оценке срезов, подвергнутых иммуногистохимическому окрашиванию на IL-1 β , IL-6, TNF- α , наблюдали положительное окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток и цитоплазмы иммунных клеток, инфильтрирующих паренхиму легкого и находящихся в просвете альвеол, а также положительное окрашивание межклеточного вещества (рис. 1 В–D). При исследовании слизистой оболочки бронхов, окрашенных на IL-1 β , наблюдали также участки ядерного положительного окрашивания эпителиальных клеток. В срезах, окрашенных на CD31, отметили положительное и цитоплазматическое окрашивание эндотелиоцитов (рис. 1 E), а в срезах, окрашенных на Ki-67, – ядерное положительное окрашивание иммунных клеток и альвеолоцитов (рис. 1 F).

При сравнении данных по базальной иммуногистохимической реакции на IL-1 β , полученных из одинаковых областей контрольных групп разного возраста (группы 1 и 2), отмечено, что ее уровни в легких возрастают к 8–10-недельному возрасту по сравнению с возрастом 4–6 недель (рис. 2). Статистически значимое увеличение обнаруживается при исследовании слизистой оболочки бронхов. При исследовании неизменных областей паренхимы и области консолидации тенденция к увеличению сохраняется, однако в данном исследовании различия оказались статистически незначимыми. Также в контрольных группах к 8–10-недельному возрасту наблюдалась тенденция к возрастанию индекса пролиферации Ki-67. Относительная площадь капиллярной сети легких (CD31-положительно окрашенная площадь), напротив, достоверно уменьшалась (рис. 3). Сравнение выраженности иммуногистохимической реакции на TNF- α не выявило статистически значимых различий между контрольными группами разного возраста (группы 1 и 2), однако, как и в случае с IL-1 β , наблюдалась тенденция к увеличению иммуногистохимической реакции на маркер у животных в возрасте 8–10 недель.

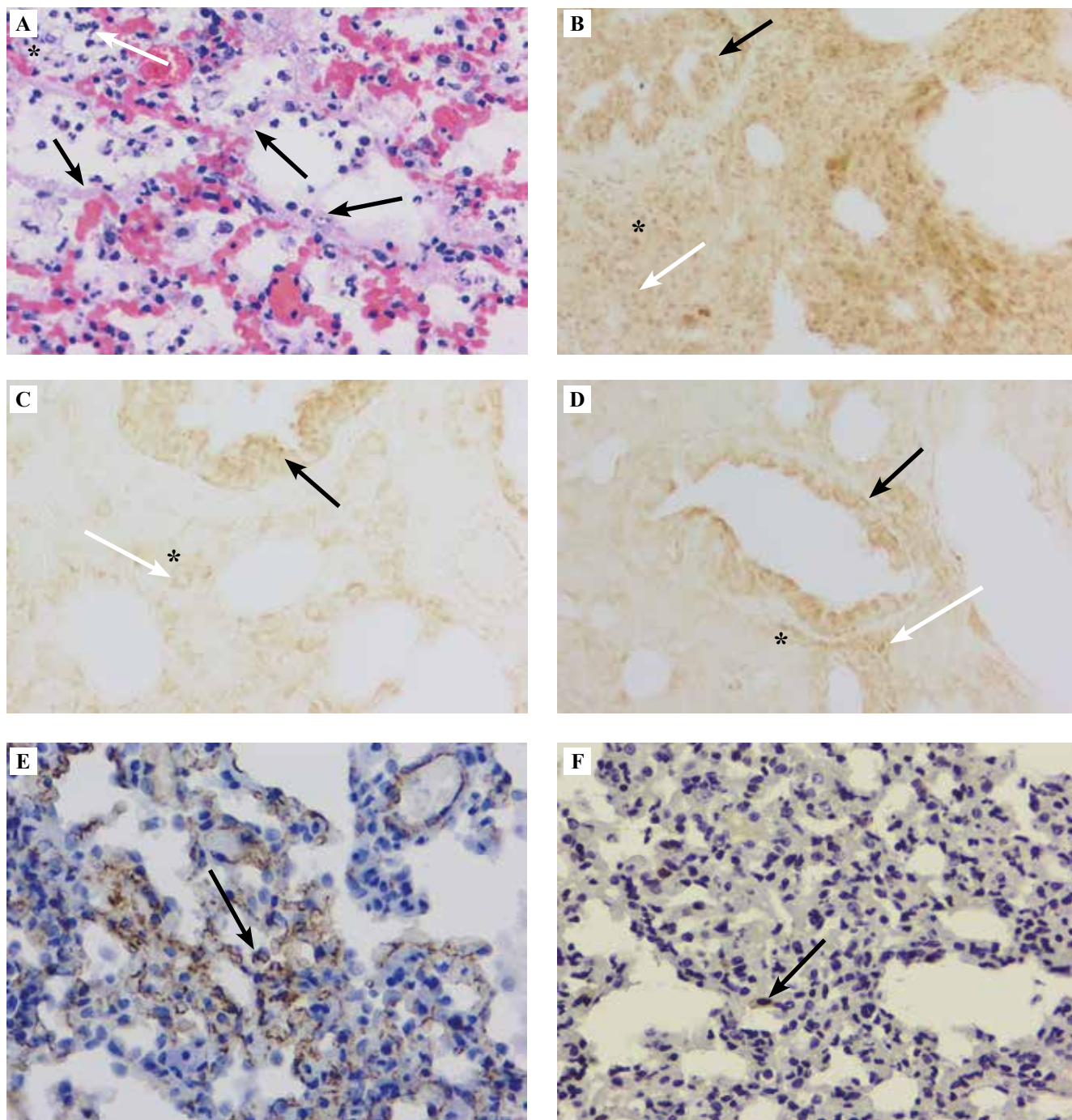


Рис. 1. Репрезентативные изображения результатов гистологического (А) и иммуногистохимического (В–F) исследований. А – гиалиновые мембраны, выстилающие альвеолы (черные стрелки), нейтрофилы в просвете альвеол и инфильтрирующие паренхиму легкого (белая стрелка), отек (звездочка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. В, С, D – положительное окрашивание эпителиальных клеток (черные стрелки), иммунных клеток (белые стрелки) и положительное окрашивание межклеточного вещества (звездочки). ИГХ исследование с антителами IL-1 β (В), IL-6 (С), TNF- α (D), $\times 200$. E – положительное окрашивание эндотелиоцитов (стрелка). ИГХ исследование с антителами CD31 и докрасивание гематоксилином, $\times 400$. F – положительное окрашивание ядер (стрелка). ИГХ исследование с антителами Ki-67, докрасивание гематоксилином, $\times 400$

Fig. 1. The results of histological (A) and immunohistochemical (B–F) assays.

A – hyaline membranes lining the alveoli (black arrows), neutrophils located in the alveolar lumen and infiltrating the lung parenchyma (white arrow), edema (asterisk). H&E stain, $\times 400$. B, C, D – positive staining of epithelial cells (black arrows), immune cells (white arrows), the intercellular substance (asterisks). IHC assay with antibodies to IL-1 β (B), IL-6 (C), TNF- α (D), $\times 200$. E – positive staining of endothelial cells (arrow). IHC assay with antibodies to CD31 and additional hematoxylin stain, $\times 400$. F – positive staining of nuclei (arrow). IHC assay with antibodies to Ki-67 and additional hematoxylin stain, $\times 400$

Таблица 2 | Table 2

Результаты исследования количества бокаловидных клеток через 72 часа после моделирования патологии |
Results of studying the number of goblet cells 72 hours after modeling the pathology

Исследуемый параметр Studied parameter	Группа 1 Group 1	Группа 3 Group 3	Группа 2 Group 2	Группа 4 Group 4
	4–6 недель, контроль 4–6 weeks, control	4–6 недель, ОРДС 4–6 weeks, ARDS	8–10 недель, контроль 8–10 weeks, control	8–10 недель, ОРДС 8–10 weeks, ARDS
Масса животных, г Animals' weight, g M±SEM	148±2		259±3	
Число измерений, n Measurement number, n	10	10	10	10
Бокаловидные клетки, штук на 500 мкм, ^A Goblet cells, unit per 500 μm, ^A M±SEM	4,7±0,56	38,9±4,68 ^B	5,5±1,19	43,7±5,12 ^C

1 ^A – данные соответствовали закону нормального распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора «группа» на показатель «Бокаловидные клетки» ($p < 0,05$; примечания 2 и 3);

2 ^B – статистически значимые отличия группы 3, получившей ЛПС в дозе 15 мг/кг, в сравнении с группой 1 (критерий Тьюки, $p = 0,00016$);

3 ^C – статистически значимые отличия группы 4, получившей ЛПС в дозе 15 мг/кг, в сравнении с группой 2 (критерий Тьюки, $p = 0,00016$)

1. ^A – The data conformed to the normal distribution law. One-way analysis of variance (ANOVA) revealed the influence of the factor “group” on the indicator “Goblet cells” ($p < 0.05$; see notes 2 and 3);

2. ^B – Statistically significant differences in group 3, which received LPS at a dose of 15 mg/kg, compared to group 1 (Tukey’s test, $p = 0.00016$);

3. ^C – Statistically significant differences in group 4, which received LPS at a dose of 15 mg/kg, compared to group 2 (Tukey’s test, $p = 0.00016$)

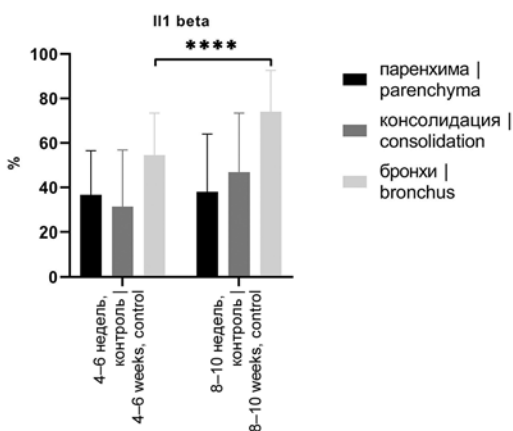


Рис. 2. Уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β в группах контроля разного возраста

% – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); **** – критерий Манна–Уитни, $p = 0,000084$

Fig. 2. Immunohistochemical expression levels of IL-1 β in the control groups of different ages

% – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); **** – Mann–Whitney test, $p = 0.000084$

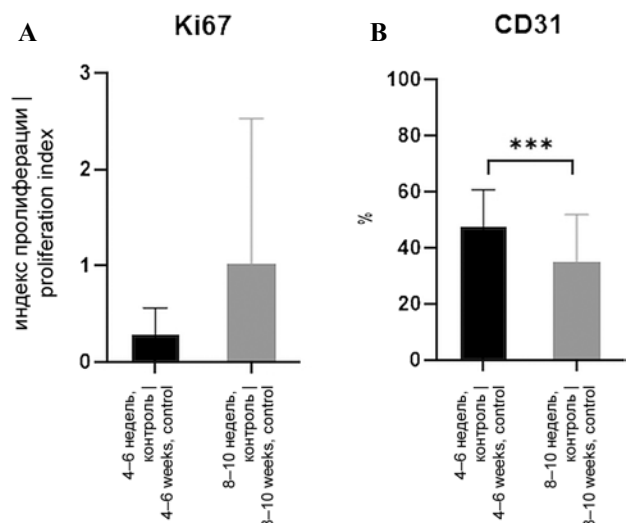


Рис. 3. Уровни иммуногистохимической экспрессии Ki-67 (A) и CD31 (B) в группах контроля разного возраста

% – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); *** – критерий Манна–Уитни, $p = 0,0006$

Fig. 3. Immunohistochemical expression levels of Ki-67 (A) and CD31 (B) in the control groups of different ages

% – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); *** – Mann–Whitney test, $p = 0.0006$

В группе со сформированным ОРДС у животных в возрасте 4–6 недель (группа 3) наблюдали увеличение уровня IL-1 β во всех исследуемых областях (рис. 4) относительно группы контроля этого же возраста. Повышение уровня цитокина в слизистой оболочке бронхов и области консолидации паренхимы легких было статистически значимым. У животных в возрасте 8–10 недель повышение выраженности иммуногистохимической реакции на IL-1 β при моделировании патологии наблюдали только в области неизменной паренхимы.

Относительная плотность капиллярной сети легких снизилась в группе с моделированием патологии в возрасте 4–6 недель (рис. 5 А). При этом у групп в возрасте 8–10 недель моделирование патологии не оказало значимого влияния (рис. 5 А). Индекс пролиферации имел тенденцию к возрастанию в группах с моделированием патологии, однако статистически значимые различия обнаружены не были (рис. 5 В).

Обсуждение

Результаты гистологического исследования, приведенные выше, позволяют сделать вывод об успешном моделировании патологии и о возможности интерпретировать данные иммуногистохимического окрашивания в контексте влияния на него моделирования ОРДС.

Контрольная группа крыс в возрасте 8–10 недель демонстрировала более высокие базальные уровни иммуногистохимической реакции на воспалительные маркеры IL-1 β и TNF- α , а также пролиферативной активности, чем животные в возрасте 4–6 недель.

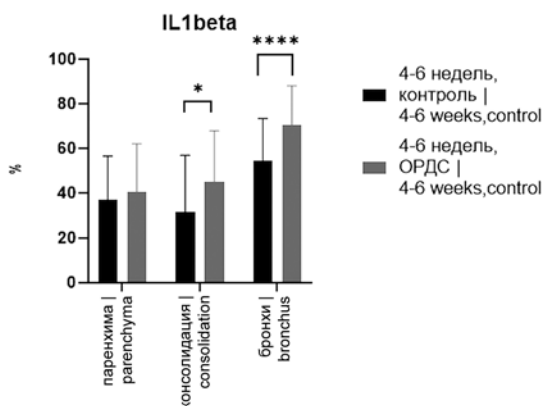


Рис. 4. Уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β % – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); * – критерий Манна–Уитни, $p=0,0320$; *** – критерий Манна–Уитни, $p<0,001$

Fig. 4. Immunohistochemical expression levels of IL-1 β % – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); * – Mann–Whitney test, $p=0.0320$; *** – Mann–Whitney test, $p<0.001$

Относительная площадь сосудистой сети легких, напротив, снижалась с возрастом. Уровень воспалительных цитокинов ни в одной из исследуемых областей обеих контрольных групп не был абсолютно нулевым. Эти данные следует учитывать при планировании исследований ОРДС и анализе результатов.

В предыдущих работах, посвященных ОРДС, при измерении концентраций TNF- α и IL-1 β в бронхоальвеолярном лаваже человека методом иммуноферментного анализа авторы отмечали их повышение в первый день после установления факта развития патологии [5, 11]. Тем не менее в исследовании на мышах [12], в котором концентрация TNF- α и IL-1 β измерялась в гомогенате легких методом полимеразной цепной реакции, изменение концентрации этих цитокинов не обнаружено.

В настоящей работе отмечено повышение уровней IL-1 β при моделировании патологии, что согласуется с данными, полученными у человека. При этом животные в возрасте 4–6 недель показали большую чувствительность к влиянию моделирования патологии на уровень иммуногистохимической реакции на IL-1 β . Вероятно, это связано с более низкими базальными

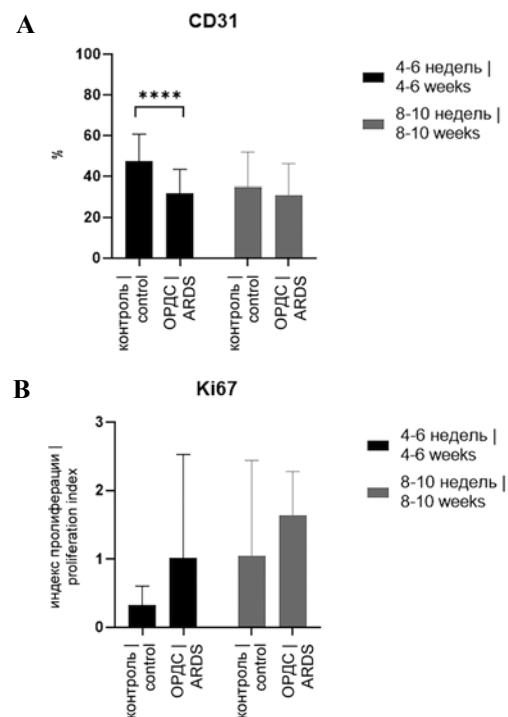


Рис. 5. Уровни иммуногистохимической экспрессии CD31 (А) и Ki-67 (В) % – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); **** – критерий Манна–Уитни, $p<0,00001$

Fig. 5. Immunohistochemical expression levels of CD31 (A) and Ki-67 (B) % – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); **** – Mann–Whitney test, $p<0.00001$

уровнями данного цитокина по сравнению со старшей возрастной группой. Согласно полученным нами данным, наиболее показательными для исследования являются область консолидации и слизистая оболочка бронхов.

Опираясь на результаты, полученные по уровню TNF α , мы не можем рекомендовать этот цитокин как иммуногистохимический маркер выраженности ОРДС, индуцируемого липополисахаридом. Значимые изменения концентрации цитокина обнаружены не были.

Животные в возрасте 4–6 недель оказались также более чувствительны к влиянию моделирования патологии на эндотелий сосудов. В данной возрастной группе площадь положительной на CD31 области значительно снижалась у животных со сформированным ОРДС. Полученные результаты демонстрируют снижение относительной плотности капиллярной сети в образцах с формированием патологии, что в контексте нашего исследования может свидетельствовать о сосудистом повреждении.

Кроме того, достоверные различия не обнаружены при исследовании пролиферативной активности в тканях легких. Это может быть связано с тем, что для оценки изменения этого показателя использованы случайные области легких. Также это может быть связано с преобладанием на этой стадии ОРДС альтернативных процессов над пролиферативными. Ki-67 будет потенциально показательным на более поздних стадиях развития патологии как один из маркеров репаративных процессов и фиброза. Ожидается, что изменения индекса пролиферации будут наблюдаться при исследовании альвеолоцитов и миофибробластов, что послужит потенциальным маркером выраженности пролиферативной стадии.

Заключение

Ориентируясь на результаты данного исследования, мы можем рекомендовать в качестве иммуногистохимических маркеров выраженности острого респираторного дистресс-синдрома на 4-й день развития патологии IL-1 β как воспалительный цитокин и CD31 как эндотелиальный маркер. Возраст животных 4–6 недель по результатам этого исследования показал более стабильные результаты в изменении маркеров и, на наш взгляд, является предпочтительным. Стоит отметить, что при планировании исследования с моделированием острого респираторного дистресс-синдрома необходимо учитывать временную точку забора легких для исследования. Полученные данные могут оказаться неактуальными для более ранних или поздних сроков течения патологии. Также при планировании исследования иммуногистохимической реакции на IL-1 β следует обратить внимание на выбор исследуемых областей и отдавать предпочтение области паренхимы на периферии очага консолидации и слизистой оболочке бронхов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Сапрыкина, М.Н. Макарова.

Сбор и обработка материала – Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина, Я.А. Гушин, А.А. Сапрыкина.

Написание текста – Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина.

Редактирование – М.Н. Макарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.A. Saprykina, M.N. Makarova.

Collected the data and performed the analysis – Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina, Ya.A. Gushchin, A.A. Saprykina.

Wrote the paper – Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina.

Edited the manuscript – M.N. Makarova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Яцков И.А., Белоглазов В.А., Ряпова Э.И. Липополисахарид и ОРДС, вызванный новой коронавирусной инфекцией: гипотезы и факты. Медицинская иммунология. 2022;24(1):7–18. DOI: 10.15789/1563-0625-LAA-2229.
Yatskov IA, Beloglazov VA, Ryapova EI. Lipopolysaccharide and ARDS caused by new coronavirus infection: hypotheses and facts. Medical Immunology = Meditsinskaya Immunologiya. 2022;24(1):7–18 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-LAA-2229.
2. Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимиров О.О., Ильинский Н.С. и др. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомьяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(4):25–34. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.
Chepur SV, Tyunin MA, Myasnikov VA, Alekseeva II, Vladimirova OV, Ilinskiy NS et al. Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*. Clinical and experimental morphology. 2021;10(4):25–34 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.
3. Garth J, Barnes JW, Krick S. Targeting cytokines as evolving treatment strategies in chronic inflammatory airway diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(11):3402. DOI: 10.3390/ijms19113402.
4. Burnham EL, Janssen WJ, Riches DW, Moss M, Downey GP. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. Eur Respir J. 2014;43(1):276–85. DOI: 10.1183/09031936.00196412.
5. Bhargava M, Wendt CH. Biomarkers in acute lung injury. Transl Res. 2012;159(4):205–17. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.01.007.
6. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
7. Blondonnet R, Constantin JM, Sapin V, Jabaudon MA. Pathophysiologic approach to biomarkers in acute respiratory distress syndrome. Dis Markers. 2016;2016:3501373. DOI: 10.1155/2016/3501373.
8. Kadam AH, Schnitzer JE. Characterization of acute lung injury in the bleomycin rat model. Physiol Rep. 2023;11(5):e15618. DOI: 10.14814/phy2.15618.

9. Пугач В.А., Тюнин М.А., Власов Т.Д., Ильинский Н.С., Гоголевский А.С., Чепур С.В. Биомаркеры острого респираторного дистресс-синдрома: проблемы и перспективы их применения. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2019;4:38–46. DOI: 10.21292/2078-5658-2019-16-4-38-46.
Pugach VA, Tyunin MA, Vlasov TD, Ilinskiy NS, Gogolevskiy AS, Chepur SV. Biomarkers of acute respiratory distress syndrome: problems and prospects of their application. Messenger of anesthesiology and resuscitation = Vestnik anesteziologii i reanimatologii. 2019;16(4):38–46 (In Russ.). DOI: 10.21292/2078-5658-2019-16-4-38-46.
10. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? J Pharmacol Pharmacother. 2013;4(4):303–6. DOI: 10.4103/0976-500X.119726.
11. Zeng Z, Yu H, Chen H, Qi W, Chen L, Chen G et al. Longitudinal changes of inflammatory parameters and their correlation with disease severity and outcomes in patients with COVID-19 from Wuhan, China. Crit Care. 2020;24(1):525. DOI: 10.1186/s13054-020-03255-0.
12. Помяткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. Биомедицина. 2020;16(4):24–33. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
Pomytkin IA, Karkischenko VN., Fokin YuV, Nesterov MS, Petrova NV. A model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Journal Biomed. 2020;16(4):24–33 (In Russ.). DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.

Информация об авторах

Жанна Юрьевна Устенко – кандидат ветеринарных наук, заместитель руководителя отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Анастасия Игоревна Савватейкина – врач-патоморфолог отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Анастасия Александровна Сапрыкина – младший научный сотрудник НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Ярослав Александрович Гущин – руководитель отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Марина Николаевна Макарова – доктор медицинских наук, директор НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Author information

Zhanna Yu. Ustenko – Cand. Sci. (Vet.), Deputy Head of the Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0003-1299-0200>

Anastasiya I. Savvateikina – Pathologist, Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-5039-885X>

Anastasiya A. Saprykina – Junior Researcher, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7588-3982>

Yaroslav A. Gushchin – Head of the Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7656-991X>

Marina N. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Director of the RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы: два клинических наблюдения

Е.А. Дубова, М.А. Шехтер, К.А. Павлов

ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. Первичная плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы – редкая агрессивная опухоль экзокринной части поджелудочной железы протокового происхождения с плохим ответом на существующие варианты терапии и высокой летальностью. В статье описаны два собственных наблюдения плоскоклеточной карциномы поджелудочной железы.

Ключевые слова: плоскоклеточная карцинома, поджелудочная железа, клинический случай

Для корреспонденции: Мария Александровна Шехтер. E-mail: shehter@pathologeek.ru

Для цитирования: Дубова Е.А., Шехтер М.А., Павлов К.А. Плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы: два клинических наблюдения. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):79–84. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.79-84.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 25.09.2023. Получена после рецензирования 14.12.2023. Принята в печать 01.04.2024.

Squamous cell carcinoma of the pancreas: two case reports

E.A. Dubova, M.A. Shehter, K.A. Pavlov

Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Primary squamous cell carcinoma of the pancreas is an extremely rare and aggressive subtype of pancreatic cancer of ductal origin. It is associated with a poor prognosis, and there is currently no optimal treatment strategy for it. The article gives literature review and describes two case reports of squamous cell carcinoma of the pancreas.

Keywords: squamous cell carcinoma, pancreas, case report

Corresponding author: Maria A. Shehter. E-mail: shehter@pathologeek.ru

For citation: Dubova E.A., Shehter M.A., Pavlov K.A. Squamous cell carcinoma of the pancreas: two case reports. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):79–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.79-84.

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

Received 25.09.2023. **Received in revised form** 14.12.2023. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Первичная плоскоклеточная карцинома (ПКК) поджелудочной железы (ПЖ) – редкая злокачественная опухоль экзокринной части ПЖ протокового происхождения с плохим прогнозом. Она составляет примерно 1% всех злокачественных опухолей ПЖ и от 0,5 до 5% экзокринных карцином этого органа. Прежде чем ставить диагноз «первичная плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы», необходимо тщательно исследовать материал и исключить как другие первичные новообразования ПЖ, так и первичные плоскоклеточные опухоли иных локализаций с метастазами в ПЖ, особенно в тех случаях, когда новообразование имеет исключительно плоскоклеточную дифференцировку [1–3].

Подавляющее большинство опухолей ПЖ происходит из клеток протоков и представлено протоковыми аденокарциномами [2]. Плоскоклеточные формы рака для карцином ПЖ нетипичны и обычно развиваются в составе традиционной протоковой аденокарциномы. Если плоскоклеточный компонент опухоли составляет не менее 30%, новообразования классифицируются как железисто-плоскоклеточный рак. Железисто-плоскоклеточный рак встречается в 1–4% наблюдений экзокринных опухолей ПЖ [1]. Истинная плоскоклеточная карцинома ПЖ встречается не более чем в 5% наблюдений экзокринных опухолей ПЖ, однако и эта цифра может быть завышена, так как железисто-плоскоклеточную карциному часто ошибочно принимают за истинную плоскоклеточную карциному [2].

Патофизиологические механизмы возникновения ПКК ПЖ пока до конца не ясны. Существует несколько теорий, объясняющих возможное происхождение этой опухоли: 1) злокачественная трансформация мультипотентных стволовых клеток-предшественниц, способных к дифференцировке как в железистый, так и в плоский эпителий, 2) плоскоклеточная трансформация предсуществующей аденокарциномы, 3) злокачественная трансформация аберрантных или эктопированных клеток плоского эпителия, 4) злокачественная трансформация участков плоскоклеточной метаплазии, возникших вследствие хронического панкреатита [2, 4, 5]. Плоскоклеточная метаплазия протоков ПЖ при хроническом воспалении связана с дифференцировкой стволовых клеток-предшественниц в сторону плоского эпителия и является частой находкой у пациентов с хроническим панкреатитом. С другой стороны, плоскоклеточная метаплазия встречается довольно часто, а ПКК ПЖ очень редко, что говорит о потенциальной роли какого-то другого, вероятно не единственного, патологического фактора, способствующего развитию этого типа опухоли [5].

Специфические факторы риска для ПКК ПЖ неизвестны. Факторы риска, характерные для протоковой аденокарциномы ПЖ, по всей видимости, играют роль и в развитии ПКК ПЖ. Клиническая картина мало отличается от проявлений протоковой аденокарциномы и включает боль в животе, спине, желтуху, анорексию [2]. ПКК ПЖ чаще встречается у пожилых людей. Возраст пациентов варьирует от 39 до 93 лет, а средний возраст составляет 69 лет. 78% наблюдений приходится на пациентов старше 60 лет. Опухоль одинаково часто встречается как у мужчин, так и у женщин. Ранее считалось, что в равной степени поражаются как головка, так и тело и хвост, но, по данным W.X. Qin et al. [2], в 42,9% наблюдений поражена головка железы, в 13,4% тело и в 17,9% хвост. Опухоль может быть многоузловой и вовлекать сразу несколько отделов железы [2, 3]. В большинстве случаев она обнаруживается случайно уже на поздних стадиях. Так, в 2019 году при анализе национальной базы данных пациентов онкологического профиля (2004–2015) S.H. Tella et al. выявили 515 случаев ПКК ПЖ, что составило всего 0,28% от всех опухолей ПЖ за данный период, при этом у 14% пациентов диагноз был установлен на III стадии, а у 62% на IV стадии, для которой характерны метастазы в печени (32%) и легких (6%) [3]. Почти у 95% пациентов обнаруживаются отдаленные или местные метастазы, при этом, как правило, поражаются регионарные лимфатические узлы, печень, легкие и кости [2].

Клиническое наблюдение № 1

Женщина 68 лет поступила в плановом порядке для лечения псевдокисты хвоста ПЖ. При поступлении жалобы активно не предъявляла. Из анамнеза известно, что два года назад у пациентки развилась клиническая картина острого панкреатита с панкреонекрозом и ис-

ходом в гигантскую кисту. Киста была трижды дренирована. При поступлении в центр при ультразвуковом исследовании в проекции хвоста ПЖ определено тонкостенное кистозное образование размерами 9,3×8,2×9,6 см с четкими волнистыми контурами и анэхогенным содержимым. При КТ исследовании по нижней поверхности ПЖ на границе хвоста и тела в парапанкреатической клетчатке определена киста размерами 5,5×3,8×4,9 см, связанная с протоковой системой. Вирсунгов проток не расширен. По результатам лабораторных данных выявлен лейкоцитоз до 20,5×10⁹/л. По результатам инструментальных и лучевых исследований, а также консультаций специалистов были исключены другие источники плоскоклеточной карциномы.

Пациентке выполнены корпорокаудальная резекция ПЖ, спленэктомия.

На патоморфологическое исследование присланы тело и хвост поджелудочной железы размерами 8,5×4,3 см с прилежащим кистозным образованием размерами 7,5×4×2,5 см и селезенкой размерами 13,0×8,0×5,0 см. На разрезе стенка кисты толщиной 0,2 см, внутренняя поверхность гладкая, блестящая, сероватого цвета, в просвете жидковатое содержимое сероватого цвета. В прилежащей к кисте ткани ПЖ расширенные протоки, плотные участки беловато-сероватого цвета (рис. 1 А). Для гистологического исследования материал ПЖ с образованием в работу взят тотально.

При гистологическом исследовании в ткани хвоста ПЖ определяются разрастания фиброзной ткани с грануляциями, выраженной лимфоплазмоцитарной с примесью нейтрофилов и макрофагов инфильтрацией, участками кровоизлияний, формированием мелких псевдокист, стенки которых представлены грануляционной тканью с очагами абсцедирования. На этом фоне в части протоков железы обнаружены явления слабой дисплазии эпителия (low-grade PanIN), а также выраженное кистозное расширение периферических протоков, частью с формированием ретенционных кист, стенки которых представлены фиброзной тканью, выстланной одним слоем уплощенных, кубических и призматических клеток панкреато-билиарного тракта. В самой крупной кисте выявлена очаговая плоскоклеточная метаплазия эпителия выстилки с участками инвазивного роста опухоли в стенку кисты и прилежащей ткани железы в виде пластов крупных атипичных полигональных клеток с различимыми межклеточными контактами, обильной эозинофильной цитоплазмой, выраженно полиморфными ядрами и большим количеством митозов. Отмечаются признаки патологического ороговения в виде формирования роговых жемчужин (рис. 1 В). При иммуногистохимическом исследовании в цитоплазме опухолевых клеток выявлена положительная реакция на цитокератин 5/6 (CK5/6) (рис. 1 С), в ядрах – реакция на p40 (protein 40) (рис. 1 D). Отмечаются многочисленные участки периневральной инвазии опухоли, признаки лимфосудистой инвазии не выявлены. Максимальный размер

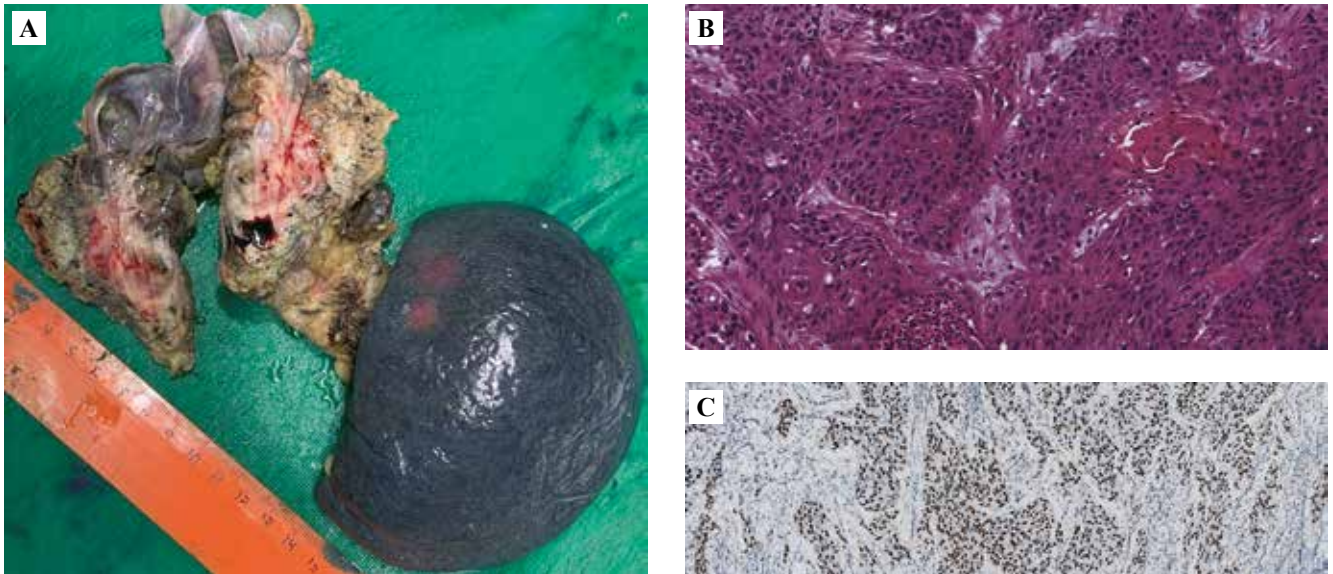


Рис. 1. Плоскоклеточная карцинома хвоста поджелудочной железы у женщины 68 лет.
 А – макроскопический вид на разрезе удаленного образования поджелудочной железы. В – солидные пласты с формированием роговых жемчужин. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. С – экспрессия CK5/6 в клетках опухоли. Иммуногистохимический метод, $\times 100$. D – экспрессия p40 в ядрах клеток опухоли. Иммуногистохимический метод, $\times 100$

Fig. 1. Squamous cell carcinoma of the pancreas in the woman, 68 y.o.
 A – gross specimen after pancreatic resection.
 B – histological findings showed sheets of squamous cells with keratin pearls. H&E stain, $\times 200$. C – CK5/6 expression in tumor cells. IHC assay, $\times 100$. D – p40 nuclear expression in tumor cells. IHC assay, $\times 100$

опухоли 1,5 см. Новообразование ограничено тканью ПЖ. В крае резекции ПЖ признаки опухолевого роста не обнаружены. Признаки опухолевого роста в отдельно присланном лимфатическом узле не выявлены.

На основании проведенного морфологического исследования диагностирован плоскоклеточный ороговевающий рак хвоста ПЖ максимальным размером 1,5 см, ограниченный тканью ПЖ, с признаками периневральной инвазии, без признаков опухолевого роста в крае резекции ПЖ, без признаков лимфосудистой инвазии, без метастаза в одном исследованном лимфатическом узле, pT1c pN0 R0.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Через 13 дней после вмешательства пациентка выписана в удовлетворительном состоянии под наблюдение хирурга и онколога по месту жительства.

Клиническое наблюдение № 2

Мужчина 67 лет поступил в плановом порядке для оперативного лечения. Пациент предъявлял жалобы на общую слабость, пожелтение склер и кожных по-

кровов, снижение веса. Из анамнеза известно, что при амбулаторном обследовании по данным УЗИ выявлено образование головки ПЖ. При КТ исследовании в панкреатодуоденальной области определено образование размерами 4,3 \times 4,6 \times 6,6 см, вовлекает нисходящий отдел двенадцатиперстной кишки и головку ПЖ, структура неоднородная, просвет двенадцатиперстной кишки деформирован. Образование контактирует с конfluence портальной вены. Отмечен стеноз чревного ствола до 2,5 мм между ножками диафрагмы. По данным лабораторных методов исследования отмечено нарастание уровня билирубина (общий до 271,3 мкмоль/л, прямой до 203,8 мкмоль/л), в связи с чем пациенту установлена разгрузочная холицистостома. По результатам инструментальных и лучевых исследований, а также консультаций специалистов были исключены другие источники плоскоклеточной карциномы.

Пациенту выполнена операция в объеме пилоросохраняющей панкреатодуоденальной резекции, холецистэктомии, забрюшинной лимфаденэктомии,

чревно-мезентериальной нейродиссекции, лимфаденэктомии гепатодуоденальной связки, резекции конfluence передней поверхности правой почечной и нижней полой вен с аутопластикой, а также формированием панкреатикоэнтеро-, холедохоэнтеро-, дуоденоэнтеро- и энтероэнтероанастомозов на петле по Ру в условиях временного дренирования через подвешную энтеростому.

На морфологическое исследование прислан панкреатодуоденальный комплекс с желчным пузырем. Двенадцатиперстная кишка длиной 13,0 см, диаметром 2,5 см. Прилежит головка ПЖ размерами 7,6×6,0 см. В просвете двенадцатиперстной кишки свежие красные свертки крови. В области большого дуоденального сосочка распадающиеся массы красновато-розового цвета. На разрезе в ткани ПЖ определяется опухолевидное образование, представленное мягкоэластической консистенции массами белесовато-желтоватого цвета размерами 6,5×4,5 см, прорастающее всю толщину стенки прилежащей двенадцатиперстной кишки. Холедох проходим, диаметром 2,5 см. Главный панкреатический проток непроходим. В области крючковидного отростка прилежит фрагмент стенки сосудов размерами 1,5×0,7 см. Материал ПЖ в работу взят тотально.

При гистологическом исследовании в ПЖ определяется инвазивный рост опухоли, представленной пластинами и гнездными скоплениями крупных атипичных клеток с выраженной зоинофильной цитоплазмой, хорошо различимыми клеточными мембранами с межклеточными мостиками. Ядра клеток выражено полиморфные с различимыми ядрышками, большим количеством митозов (рис. 2 А). Встречаются клетки

с гигантскими и уродливыми ядрами, а также многоядерные клетки. В части клеток выявлены признаки секреции кератина в виде плотных зоинофильных включений в цитоплазме. Имеются участки патологического ороговения (роговые жемчужины). В части скоплений опухолевых клеток отмечаются акантолитические изменения с формированием мелких межклеточных полостей. Признаки железистой дифференцировки не выявлены. При иммуногистохимическом исследовании в клетках опухоли обнаружена положительная реакция на p40 (рис. 2 В) в ядрах и реакция на CK5/6 – в цитоплазме (рис. 2 С). Строма опухоли десмопластическая с умеренно выраженной лимфолейкоцитарной инфильтрацией. Обширные участки некроза ткани опухоли. Определяются многочисленные участки лимфососудистой и периневральной инвазии опухолевых структур. Структуры новообразования врастают в стенку двенадцатиперстной кишки до слизистой оболочки с образованием участков изъязвления, стенку интрапанкреатической части холедоха до слизистой оболочки, а также в окружающую железу жировую клетчатку. В краях резекции двенадцатиперстной кишки, холедоха, ПЖ признаки опухолевого роста не выявлены. Структуры опухоли тесно прилегают (в пределах 1 мм) к краю резекции крючковидного отростка ПЖ, но не вовлекают его. Отмечается вовлечение в перипухолевый фиброзный процесс стенки прилежащего фрагмента крупного венозного сосуда, однако непосредственного прорастания клеток опухоли в его стенку нет. В стенке желчного пузыря диффузная лимфоцитарная инфильтрация, признаки опухолевого роста не выявлены. В прилежащей околопанкреатической клетчатке обнаружено и исследовано 16 лимфати-

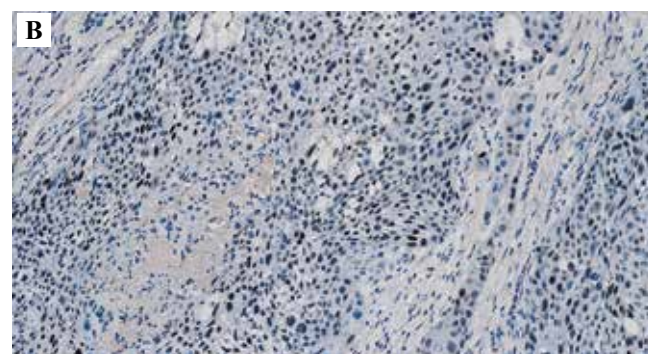
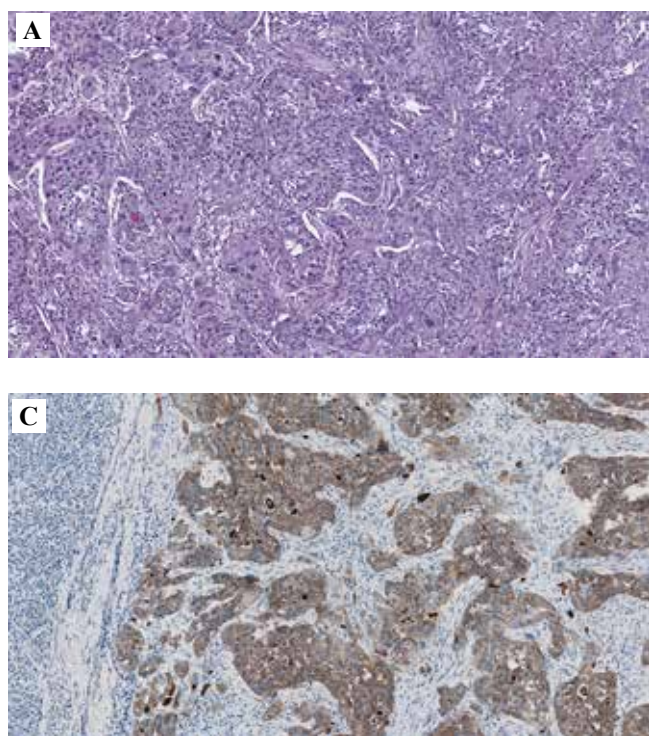


Рис. 2. Плоскоклеточная карцинома хвоста поджелудочной железы у мужчины 67 лет.

А – гистологическая картина. Окраска гематоксилином и эозином, ×100. В – экспрессия p40 в ядрах клеток опухоли. Иммуногистохимический метод, ×100.
С – экспрессия CK5/6 в клетках опухоли. Иммуногистохимический метод, ×100

Fig. 2. Squamous cell carcinoma of the pancreas in the man, 67 y.o.

А – histological findings. H&E stain, ×100. В – p40 nuclear expression in tumor cells. IHC assay, ×200.
С – CK5/6 expression in tumor cells. IHC assay, ×100

ческих узлов, в трех из которых выявлены метастазы опухоли.

В результате проведенного морфологического исследования у пациента диагностирован плоскоклеточный ороговевающий рак головки ПЖ максимальным размером 6,0 см, прорастающий в стенку двенадцатиперстной кишки, интрапанкреатическую часть холедоха, прилежащую перипанкреатическую клетчатку, без признаков опухолевого роста в крае резекции ПЖ, с участками периневральной и лимфососудистой инвазии, с метастазами в трех из 16 лимфатических узлов, pT3 pN1 R0.

В удовлетворительном состоянии через 18 дней после операции пациент выписан под наблюдение онколога, хирурга и гастроэнтеролога по месту жительства.

Обсуждение

Первичная плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы является диагнозом исключения и устанавливается после того как опровергнут диагноз других первичных опухолей ПЖ и метастазов плоскоклеточной карциномы иных локализаций (например, легких, щитовидной железы или пищевода). В наших наблюдениях другие источники плоскоклеточной карциномы были исключены при инструментальных и лучевых методах исследования на дооперационном этапе. Тонкоигольная биопсия под контролем УЗИ получила широкое распространение для выявления солидных образований ПЖ и отличается высокой чувствительностью и специфичностью [6], однако в наших наблюдениях данное исследование выполнено не было.

Большинство плоскоклеточных карцином характеризуется инфильтративным ростом, на разрезе твердые, от серого до желтовато-белого цвета. Часто наблюдаются центральные некрозы и кистозная дегенерация [1]. Что касается наших случаев, то в первом, у женщины 68 лет, плоскоклеточный рак, наиболее вероятно, развился из стенки ретенционной кисты, о чем свидетельствуют участки плоскоклеточной метаплазии эпителия выстилки кисты. Во втором наблюдении образование было представлено солидными массами бело-желтого цвета.

Истинная плоскоклеточная карцинома характеризуется исключительной плоскоклеточной дифференцировкой без железистого компонента и без признаков слизееобразования [1, 5, 7]. В наших наблюдениях при микроскопическом исследовании плоскоклеточная дифференцировка опухоли подтверждалась наличием солидных участков и полей полигональных клеток с четкими границами, хорошо различимыми межклеточными контактами (мостиками), обильной эозинофильной цитоплазмой, различного размера гиперхромными ядрами с маленькими ядрышками, признаками кератинизации вплоть до формирования роговых жемчужин. Отмечалась выраженная десмопластическая реакция стромы. Железистый компонент опухоли был исключен путем тотального исследования срезов ново-

образования, окрашенных гематоксилином и эозином. При иммуногистохимическом исследовании клетки опухоли экспрессировали CK5/6, p63, p40 [1, 5]. В обоих наших наблюдениях в клетках опухоли определялась экспрессия CK5/6 и p40, что также подтверждало плоскоклеточный характер дифференцировки.

Основные сложности патоморфологической диагностики плоскоклеточных карцином ПЖ заключаются в тотальном исследовании материала образования для исключения возможного наличия железистого компонента. Кроме того, для окончательной верификации плоскоклеточной дифференцировки опухоли необходимо проведение иммуногистохимического исследования, особенно в случаях неороговевающих плоскоклеточных карцином.

Заключение

Плоскоклеточная карцинома поджелудочной железы – редкая агрессивная опухоль с плохим ответом на лечение и высокой летальностью. Клинические проявления и диагностический подход не отличаются от таковых при других опухолях поджелудочной железы. Требуется обязательное исключение метастазов в поджелудочную железу первичных плоскоклеточных карцином иных локализаций. Часто на момент постановки диагноза стадия заболевания высокая. Оптимальной схемы лечения этой опухоли нет, однако при отсутствии противопоказаний рекомендуется проводить хирургическое лечение. Обнаружение плоскоклеточной карциномы поджелудочной железы на ранних стадиях улучшает прогноз заболевания, однако для увеличения продолжительности жизни пациентов необходимо разработать новые схемы лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. The WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds.). WHO classification of tumours. Digestive system tumours. V. 1. 5th ed. Lyon: IARC, 2019. 635 p.
2. Qin WX, Wu Y, Liu J, Qin BD, Liu K, Jiao XD et al. Primary squamous cell carcinoma of pancreas: a population-based study. *Gland Surg.* 2021;10(3):1029–37. DOI: 10.21037/gs-20-317.
3. Tella SH, Kommalapati A, Yadav S, Bergquist JR, Truty MJ, Durgin L et al. Survival and prognostic factors in patients with pancreatic squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2019;45(9):1700–5. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.05.011.
4. Alajlan BA, Bernadt CT, Kushnir VM. Primary squamous cell carcinoma of the pancreas: a case report and literature review. *J Gastrointest Cancer.* 2019;50(1):130–3. DOI: 10.1007/s12029-017-9982-1.
5. Wahab A, Gonzalez JJ, Devarkonda V, Saint-Phard T, Singh T, Adekolujo OS. Squamous cell carcinoma – a rare pancreatic exocrine malignancy. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(5):593–6. DOI: 10.1080/15384047.2018.1539291.

6. Qiu X, Meng Y, Lu M, Tian C, Wang M, Zhang J. Primary squamous cell carcinoma of the pancreas with a large pseudocyst of the pancreas as the first manifestation: a rare case report and literature review. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):208. DOI: 10.1186/s12876-021-01804-7.
7. Zhang G, Cheng ZZ, Xu GH, Jiang X, Wang XX, Wang QF. Primary squamous cell carcinoma of the pancreas with effective comprehensive treatment: a case report and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(41):e12253. DOI: 10.1097/MD.0000000000012253.

Информация об авторах

Елена Алексеевна Дубова – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии и клинической патологии с курсом судебной медицины Медико-биологического университета инноваций и непрерывного медицинского образования Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна ФМБА России.

Мария Александровна Шехтер – ординатор второго года кафедры патологической анатомии и клинической патологии с курсом судебной медицины Медико-биологического университета инноваций и непрерывного медицинского образования Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна ФМБА России.

Константин Анатольевич Павлов – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, исполняющий обязанности заведующего кафедрой патологической анатомии и клинической патологии с курсом судебной медицины Медико-биологического университета инноваций и непрерывного медицинского образования Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна ФМБА России.

Author information

Elena A. Dubova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathology with Forensic Medicine Course, Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency.
<https://orcid.org/0000-0002-7115-538X>

Maria A. Shehter – 2nd-year Resident, Department of Pathology with Forensic Medicine Course, Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency.
<https://orcid.org/0000-0002-4409-2459>

Konstantin A. Pavlov – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Acting Head of the Department of Pathology with Forensic Medicine Course, Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency.
<https://orcid.org/0000-0002-9076-8907>

© Гюева З.В., 2024

DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.85-91

УДК: 616.003.821

Особенности течения новой коронавирусной инфекции у пациентки с ревматоидным артритом и системным АА амилоидозом. Клиническое наблюдение

З.В. Гюева

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

Резюме. Пациенты с ревматоидным артритом более уязвимы перед новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) по сравнению с общей популяцией. Особенно сложное течение отмечается у людей, имеющих в качестве осложнения ревматоидного артрита системный АА амилоидоз. Представлено клинико-морфологическое наблюдение неблагоприятного исхода COVID-19 у пациентки с недиагностированным при жизни АА амилоидозом на фоне ревматоидного артрита, который в результате отсутствия патогенетической терапии привел к развитию хронической почечной недостаточности и летальному исходу.

Ключевые слова: амилоидоз, COVID-19, ревматоидный артрит, сахарный диабет, коморбидная патология, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Зарина Владиславовна Гюева. E-mail: gioeva_z@mail.ru

Для цитирования: Гюева З.В. Особенности течения новой коронавирусной инфекции у пациентки с ревматоидным артритом и системным АА амилоидозом. Клиническое наблюдение. Клин. эксп. морфология. 2024;13(3):85–91. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.85-91.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00138.

Статья поступила 18.03.2024. Получена после рецензирования 28.03.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Characteristics of the clinical course of the new coronavirus disease in a patient with rheumatoid arthritis and systemic AA amyloidosis. Clinical observation

Z.V. Gioeva

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

Abstract. Rheumatoid arthritis patients are more vulnerable to the new coronavirus disease (COVID-19) compared to general population. The most severe clinical course occurs in patients with rheumatoid arthritis complicated by AA amyloidosis affecting the kidneys and the gastrointestinal tract. I describe clinical and morphological characteristics of a female patient who died from COVID-19 and had underlying rheumatoid arthritis and AA amyloidosis which was diagnosed during postmortem examination and led to chronic renal failure and death as she did not receive specific treatment.

Keywords: amyloidosis, COVID-19, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus, comorbid pathology, immunohistochemistry

Corresponding author: Zarina V. Gioeva. E-mail: gioeva_z@mail.ru

For citation: Gioeva Z.V. Characteristics of the clinical course of the new coronavirus disease in a patient with rheumatoid arthritis and systemic AA amyloidosis. Clinical observation. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):85–91 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.85-91.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 23-15-00138.

Received 18.03.2024. **Received in revised form** 28.03.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Пандемия, вызванная новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), стала тяжелым испытанием для пациентов с иммуновоспалительными ревматическими за-

болеваниями. К настоящему времени зарегистрировано множество случаев осложненного течения COVID-19 у пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, в частности ревматоидным артритом (РА) [1].

Вероятность заражения вирусом SARS-CoV-2 при наличии РА на 25% выше, чем у здоровых людей, а риск смерти или тяжелого течения заболевания возрастает на 35% [2].

Важно подчеркнуть, что картина выброса цитокинов и иммунной активации у пациентов с COVID-19 схожа с таковой у пациентов с РА [3]. После инфицирования вирусом SARS-CoV-2 в легких индуцируется большое количество сигнальных реакций, сопровождающихся выбросом цитокинов и хемокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, и TNF- α , и рекрутированием воспалительных клеток в инфицированных участках, что приводит к острому респираторному дистресс-синдрому, множественной органной недостаточности и даже смерти [4, 5]. В локальных очагах воспаления при РА иммунные клетки и провоспалительные цитокины также играют решающую роль в патогенезе, регулируя воспаление, аутоиммунитет и деструкцию суставов, что говорит о наличии общих патологических каскадов, возникающих как при коронавирусной инфекции, так и при РА [6].

Тяжелое течение COVID-19 отмечено у пациентов, имеющих помимо РА системный АА амилоидоз, который развивается, по некоторым данным, у 10–43% пациентов с РА [7]. Вовлечение почек в патологический процесс, по разным источникам, наблюдается у 7–29% пациентов с РА и является признаком крайне неблагоприятного прогноза [8]. Присоединение коронавирусной инфекции у таких пациентов влечет за собой множество осложнений, приводящих к смерти [9].

Представляем клинический случай тяжелого течения COVID-19 у пациентки с РА и системным АА амилоидозом.

Клиническое наблюдение

Пациентка 80 лет поступила в стационар в экстренном порядке с жалобами на выраженную слабость, затрудненное дыхание и одышку в покое. При осмотре состояние тяжелое, сатурация 92%, АД 100/70 мм рт. ст. В крови отмечена азотемия, в моче – протеинурия. При проведении ПЦР в режиме реального времени был выявлен вирус SARS-CoV-2. Из анамнеза известно, что пациентка находилась на диспансерном наблюдении по поводу серонегативного РА с поражением почек, а также рака легкого, сахарного диабета 2-го типа с диабетической нефропатией и артериальной гипертензией. За месяц до поступления в стационар проходила лечение по поводу желудочного кровотечения, обусловленного синдромом Мэллори–Вейсса и ишемического инсульта (атеротромботический подтип) в вертебробазиллярном бассейне.

Лечение включало противовоспалительные и антибактериальные препараты, глюкокортикоиды, антикоагулянты, заместительную почечную терапию, генно-инженерную биологическую терапию (илсира, бавланивимаб). Несмотря на проводимую интенсивную

терапию, состояние пациентки ухудшалось, нарастали явления сердечно-легочной, почечной недостаточности, которые привели к смерти на шестые сутки после госпитализации.

Установлен клинический диагноз: основное заболевание: U07.1 – коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, вирус идентифицирован (ПЦР+, штамм B.1.617.2).

Сочетанное заболевание: ревматоидный артрит, серонегативный, поздняя клиническая стадия, активность умеренная, антитела к циклическому цитруллин-связанному пептиду отрицательные (АЦЦП –).

Осложнения основного заболевания. Внутрибольничная полисегментарная вирусно-бактериальная пневмония. КТ паттерн 1-й степени. Дыхательная недостаточность 1-й степени. Анемия тяжелой степени. Тромбоцитопения. Диабетическая макроангиопатия, микроангиопатия, нефропатия, полинейропатия. Активная мочевиная инфекция. Терминальная стадия хронической почечной недостаточности, нефропатия неясной этиологии. Синдром полиорганной недостаточности. Искусственная вентиляция легких.

Сопутствующие заболевания. Синдром Мэллори–Вейсса с развитием желудочного кровотечения. Цереброваскулярная болезнь, ишемический инсульт (атеротромботический подтип) в вертебробазиллярном бассейне, левосторонний гемипарез. Тромбоз вен нижних конечностей.

Исследование одобрено этическим комитетом НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына (протокол № 31(7) от 03.12.2021).

Патологоанатомическое исследование

При постмортальном исследовании правое легкое уменьшено в объеме (в анамнезе лобэктомия), междольевые щели запаяны, плевра полнокровная, шероховатая. На разрезе ткань правого легкого практически на всем протяжении безвоздушная, уплотненная, с поверхности разреза при надавливании – серовато-красное обильное слизистое гноевидное отделяемое. Левое легкое в верхней доле эмфизематозно вздуто, бледно-розового цвета. При микроскопическом исследовании: альвеолы расширены, стенка их истончена, разрушена, очаги разрастания рыхлой волокнистой соединительной ткани, полиморфноклеточного воспалительного инфильтрата. Неравномерное полнокровие крупных сосудов, диапедезные кровоизлияния (рис. 1 А, В). В отдельных полях зрения по ходу альвеол гиалиновые мембраны (рис. 1 В).

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к S-белку SARS-CoV-2 (клон SN0754, GeneTex, США) выявлено положительное мембрано-цитоплазматическое окрашивание пораженных вирусом клеток (рис. 2).

Сердце увеличено в размерах за счет левых отделов. Толщина стенки левого желудочка 2,0 см, правого 0,5 см. Микроскопически: разрастание узких тяжей

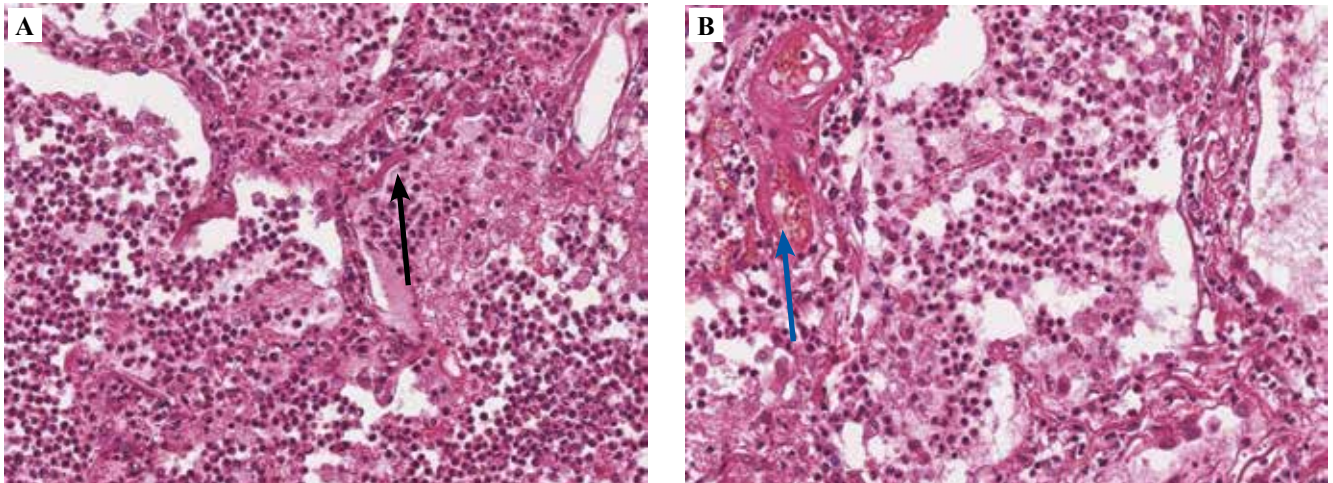


Рис. 1. Диффузное альвеолярное повреждение, пролиферативная фаза.

А – скопление альвеолоцитов, макрофагов, эритроцитов и фибрина в просвете альвеол, гиалиновые мембраны вдоль альвеол (черная стрелка). В – неравномерное полнокровие кровеносных сосудов (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 1. Diffuse alveolar damage, proliferative phase.

A – accumulation of alveolar cells, macrophages, erythrocytes, and fibrin in the alveolar lumen, hyaline membranes along the alveoli (black arrow). B – increased and uneven pulmonary vascularity (blue arrow). H&E stain, ×200

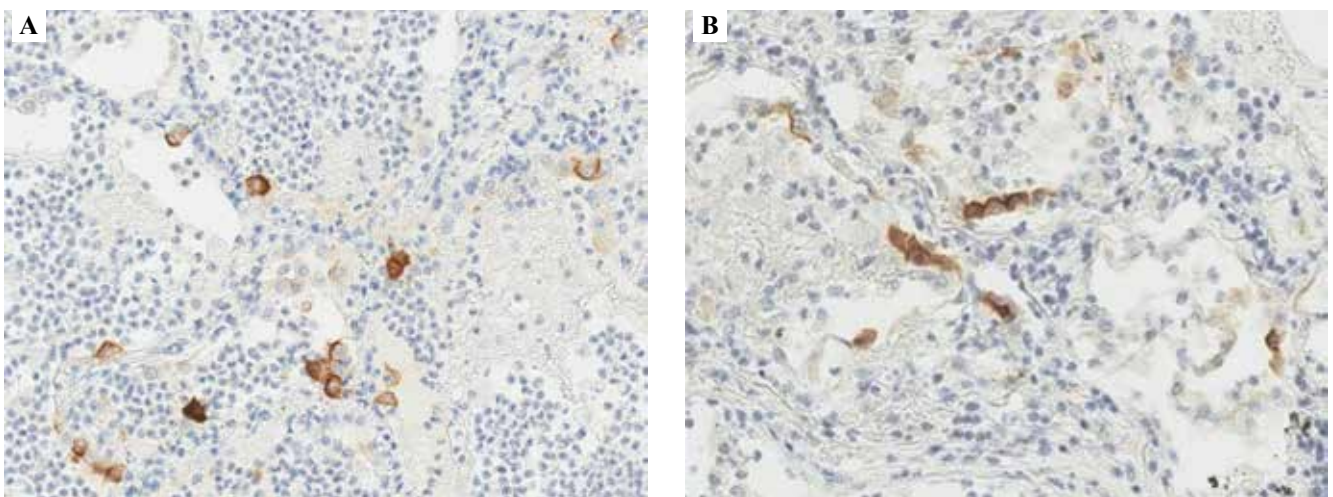


Рис. 2. Положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к ACE2 в легких. Отмечается мембрано-цитоплазматическое окрашивание клеток, пораженных SARS-CoV-2. ИГХ исследование, ×200

Fig. 2. Positive immunohistochemistry reaction with the antibodies to ACE2 in the lungs. Membranous and cytoplasmic staining of the cells affected by SARS-CoV-2 is observed. IHC assay, ×200

рыхлой волокнистой соединительной и жировой ткани, участки фрагментации кардиомиоцитов.

При макроскопическом исследовании в правой затылочной доле головного мозга обнаружены постинсультная киста диаметром 2 см и признаки вклинения базальной поверхности мозжечка в большое затылочное отверстие. При микроскопическом исследовании – периваскулярный и перичеллюлярный отек, диффузный глиоз, большое количество зернистых шаров.

Почки уменьшены в размерах, с мелкозернистой поверхностью и единичными тонкостенными кистами. На разрезе граница между корковым и мозговым

веществом нечеткая. Микроскопически клубочки склерозированы, эпителий проксимальных и дистальных канальцев в состоянии дистрофии и некроза. В клубочках, строме и стенках артериол отложения глыбчатых эозинофильных масс, которые при окрашивании конго красным и исследовании в поляризованном свете имели характерное для амилоида яблочно-зеленое свечение (рис. 3 А, В).

При микроскопическом исследовании поджелудочной железы выявлена дистрофия ацинусов, островки Лангерганса уменьшены в размерах, склерозированы, обнаружены очаги перидуктального склероза, межаци-

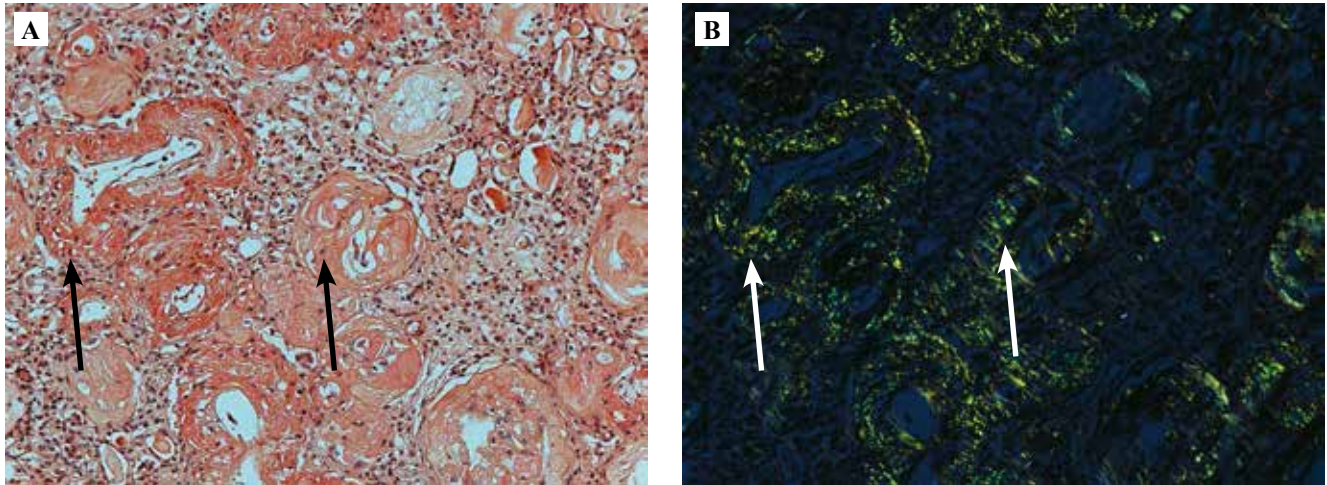


Рис. 3. Амилоидоз почек.

А – диффузное отложение конгофильных амилоидных масс в клубочках почки и стенке кровеносных сосудов (стрелка). В – при исследовании в поляризованном свете отмечается характерное для амилоида яблочно-зеленое свечение (стрелка). Окраска конго красным, $\times 200$

Fig. 3. Renal amyloidosis.

А – diffuse congophilic amyloid depositions in glomeruli and vascular walls (arrow). В – characteristic apple-green birefringence of amyloid deposits under polarized light (arrow). Congo red staining, $\times 200$

нарного липоматоза, интраваскулярные амилоидные отложения. При микроскопическом исследовании желудка и щитовидной железы также выявлены интерстициальные и интраваскулярные отложения амилоида.

Имунофенотипирование амилоидных отложений с целью идентификации белка-предшественника амилоида показало позитивную реакцию с антителами к Р-компоненту амилоида (Cloud-Clone Corp.) и АА амилоиду (Cloud-Clone Corp., США). Отмечалась отрицательная реакция с антителами к AL-каппа (Clone SH15, Leica Biosystems, Novocastra, Германия) и anti-rKLC-1 (некоммерческое антитело), AL-lambda (Clone SHL53, Leica Biosystems, Novocastra, Германия), транзитретинному амилоиду (TTR, Cloud-Clone Corp.) (рис. 4).

На основании патоморфологического, иммуногистохимического исследования, а также проведения ПЦР диагностики в режиме реального времени установлен патологоанатомический диагноз.

Основное заболевание. U07.1 Коронавирусная инфекция (COVID-19), ПЦР (+), штамм B.1.617.2.

Сочетанное заболевание. Ревматоидный артрит, серонегативный, активность умеренная, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (–), функциональный класс 3.

Осложнения основного заболевания. Очагово-сливная вирусно-бактериальная пневмония справа, фибринозно-гнойный плеврит. Вторичный АА амилоидоз с поражением почек, поджелудочной железы, желудка, щитовидной железы. Азотемия (мочевина 25,7 ммоль/л, креатинин 364,4 мкмоль/л), сеансы заместительной почечной терапии. Анемия смешанного генеза (Hb 70 г/л). Отек головного мозга.

Сопутствующие заболевания. Последствие перенесенного инсульта головного мозга – киста затылочной доли правой гемисферы. Атеросклероз сосудов основания головного мозга. Операция лобэктомии правого легкого по поводу рака в 2003 году. Сахарный диабет 2-го типа: диабетическая макро- и микроангиопатия, нефросклероз, полинейропатия (по клиническим данным).

Таким образом, из данных медицинской документации, результатов патологоанатомического вскрытия и лабораторных исследований следует, что причиной смерти пациентки явилась новая коронавирусная инфекция (COVID-19), которая с РА (сочетанное заболевание), системным АА амилоидозом и сахарным диабетом 2-го типа (сопутствующее заболевание) привела к развитию полиорганной недостаточности и смерти.

Обсуждение

Инфекционные заболевания – одна из причин преждевременной смерти пациентов с РА [3]. У пациентов с ревматическими заболеваниями иммуносупрессия и наличие сопутствующих патологий связаны с повышенным риском тяжелого течения COVID-19, вплоть до летального исхода [10].

Одним из частых осложнений РА является системный АА амилоидоз, развивающийся на фоне хронических воспалительных процессов и характеризующегося отложением в тканях и органах аномального фибриллярного белка амилоида. Белок-предшественник, сывороточный амилоид А (SAA), синтезируется в печени под влиянием провоспалительных цитокинов. В условиях острофазового ответа его концентрация в крови многократно возрастает. У некоторых пациентов длительное повышение SAA может приводить

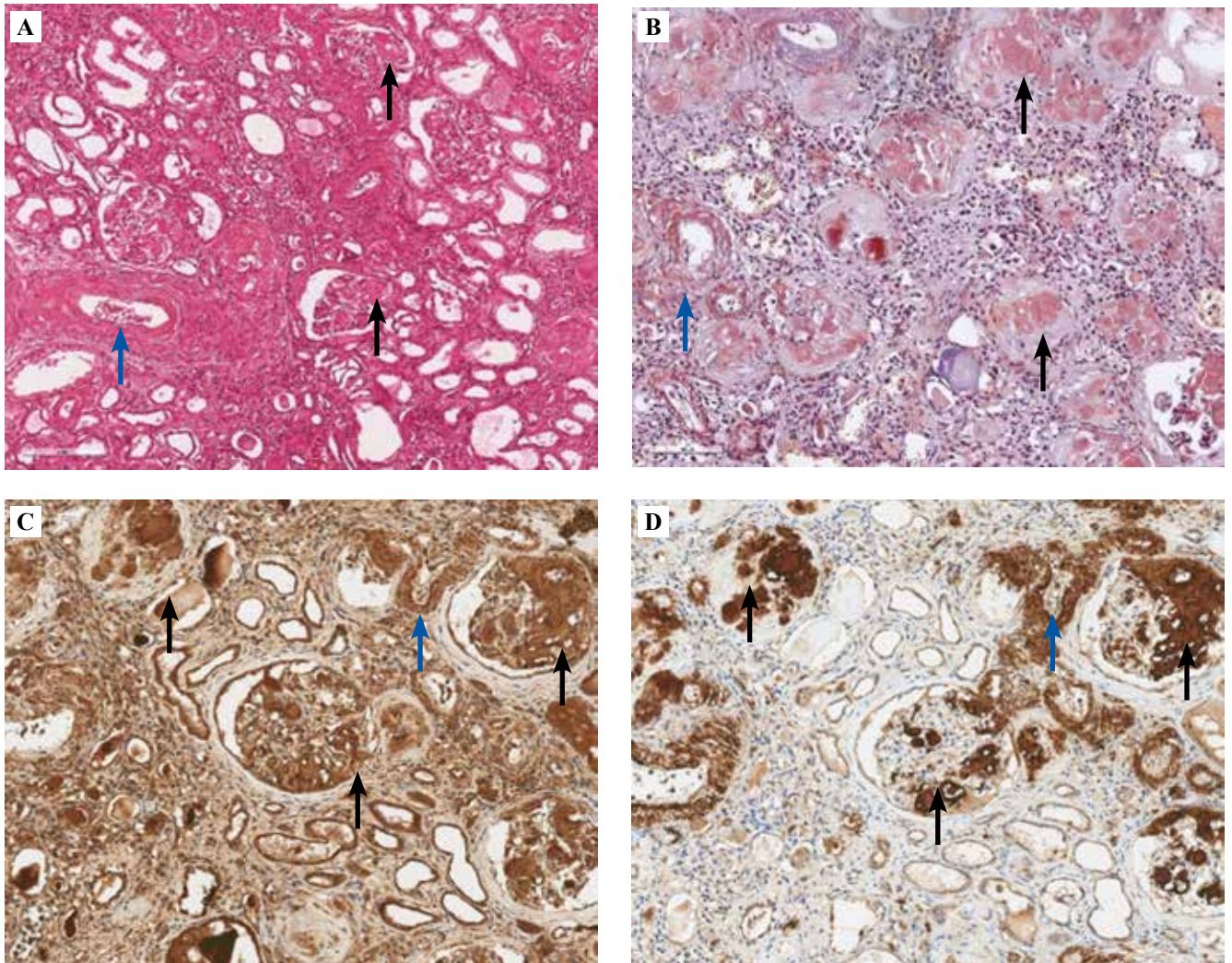


Рис. 4. Микроскопическая картина амилоидоза почек.

А – отложения гомогенных эозинофильных масс амилоида в клубочках почки (черная стрелка) и в стенке кровеносных сосудов (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. В – выраженное окрашивание амилоидных масс в клубочках почки (черная стрелка) и стенке кровеносных сосудов (синяя стрелка). Окраска конго красным, $\times 200$. С – иммунопозитивная реакция с антителом к Р-компоненту амилоида в клубочках почки (черная стрелка) и стенках кровеносных сосудов (синяя стрелка), $\times 400$. D – положительная иммуногистохимическая реакция с антителом к АА амилоиду в клубочках почки (черная стрелка) и стенках кровеносных сосудов (синяя стрелка), $\times 400$

Fig. 4. Microscopic findings of renal amyloidosis.

A – homogenous eosinophilic amyloid deposits in glomeruli (black arrow) and vascular walls (blue arrow). H&E stain, $\times 200$. B – intense positive staining with Congo red of amyloid deposits in glomeruli (black arrow) and vascular walls (blue arrow). Congo red staining, $\times 200$. C – positive immunostaining with the antibody to amyloid P component in glomeruli (black arrow) and vascular walls (blue arrow), $\times 400$. D – positive immunostaining with the antibody to AA amyloid in glomeruli (black arrow) and vascular walls (blue arrow), $\times 400$

к формированию амилоидных фибрилл. Доказано, что вероятность развития АА амилоидоза зависит от полиморфизма гена *SAA1* – изоформы острофазового SAA человека [11]. Согласно результатам исследования J. Zhou et al., включившего в себя метаанализ данных из 33 центров, было установлено, что аллель *SAA1.3* и генотип аллеля *SAA 1.3/1.3* считаются факторами риска развития РА с системным амилоидозом [12].

Поражение почек и желудочно-кишечного тракта является характерной особенностью амилоидоза при

РА. Большинство пациентов умирают от развития почечной недостаточности или кахексии, обусловленной поражением желудочно-кишечного тракта, которое проявляется в виде диарей, кровотечений, мальабсорбции в течение нескольких лет. Присоединение коронавирусной инфекции приводит к усугублению имеющегося у пациента повреждения почек, под действием вируса возникает острое повреждение канальцев, развивается повреждение клубочков, приводящее к формированию фокального сегментарного склероза [13]. В нашем на-

блюденнии у пациентки выявлено преимущественное отложение амилоида в клубочках почек и стенках кровеносных сосудов, а также признаки острого почечного повреждения с некрозом проксимальных и дистальных канальцев. Ввиду отсутствия прижизненной диагностики амилоидоза поражение почек расценивалось как нефропатия неясной этиологии, соответственно, лечение проводилось без учета наличия амилоидоза, что привело к более быстрому прогрессированию почечной недостаточности.

В клиническом наблюдении, описанном Е.В. Волошиновой и соавт., у пациентки с РА и диагностированным системным амилоидозом присоединение COVID-19 привело к развитию развернутого нефротического синдрома, потребовавшего выполнения повторной нефробиопсии для верификации характера поражения почек и исключения перекрестного синдрома в виде сочетания РА с системной красной волчанкой. По результатам нефробиопсии был подтвержден амилоидоз почек как причина нефротического синдрома [7].

В исследовании R. Haberman et al. среди всех пациентов с иммуновоспалительными заболеваниями необходимость в госпитализации при COVID-19 чаще всего возникала у пациентов с РА, имевших в качестве сопутствующей патологии сахарный диабет 2-го типа, гипертоническую болезнь или хроническое obstructивное заболевание легких [14]. У нашей пациентки помимо РА и амилоидоза в анамнезе имелся сахарный диабет 2-го типа с диабетической нефропатией, макро- и микроангиопатией, а также нефросклерозом, что привело к развитию хронической почечной недостаточности, сыгравшей ведущую роль в танатогенезе.

В представленном наблюдении в анамнезе отмечался эпизод желудочного кровотечения, клинически верифицированного как синдром Мэллори–Вейсса, однако при микроскопическом исследовании желудка в области кровотечения обнаружены обширные очаги амилоида в слизистой оболочке желудка и стенках кровеносных сосудов, что, вероятно, и явилось причиной кровотечения. В литературе имеются данные о рецидивных кровотечениях в желудочно-кишечном тракте, обусловленных ломкостью кровеносных сосудов в результате отложений в их стенках амилоидных масс [15].

Приведенное нами клиническое наблюдение подтверждает правильность суждения о том, что механизмы новой коронавирусной инфекции и аутоиммунных заболеваний имеют схожие патогенетические звенья, о чем свидетельствуют снижение иммунного статуса организма, преимущественно тяжелое течение COVID-19 у таких пациентов.

Важно отметить, что развитие системного АА амилоидоза следует рассматривать у пациентов с РА в качестве осложнения данного заболевания. При наличии амилоидоза другого типа необходимо рассматривать его как сопутствующее заболевание. Наличие у пациентки сахарного диабета 2-го типа с диабетической

макро-, микроангиопатией, диабетической нефропатией и нефросклерозом является третьим фактором негативного воздействия на почки, что имеет отражение как в клиническом течении и лабораторных данных, так и в данных патоморфологического исследования, свидетельствующих о вторичном нефросклерозе.

Заключение

Представленное клиническое наблюдение демонстрирует крайне негативное влияние ревматоидного артрита, сопровождающегося системным АА амилоидозом и сахарным диабетом 2-го типа, на течение новой коронавирусной инфекции. Сочетание описанных заболеваний быстрее приводит к развитию полиорганной недостаточности, прежде всего почечной, что является фактором риска тяжелого течения COVID-19, нередко приводящего к летальному исходу. Выраженный провоспалительный ответ, сопровождавшийся усиленной выработкой сывороточного амилоида А, вероятно, способствовал интенсификации амилоидных отложений в почках, что ускорило развитие почечной недостаточности.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

Литература/References

1. *Miklós B, Ágnes A.* AA amyloidosis and lung diseases in rheumatoid arthritis – a postmortem clinicopathologic study of 147 autopsy patients. *EC Cardiology.* 2020;7(3):01–17. Available from: https://ecronicon.net/eccy_volume7_issue3 (accessed 07.03.2024).
2. *Xiao J, Liang C, Zhang L, Li J, Liu S.* The intersection of COVID-19 and rheumatoid arthritis: shared mechanisms, treatment challenges, and potential therapeutic approaches. *Aging Dis.* 2023;14(4):1196–213. DOI: 10.14336/AD.2023.0406.
3. *Dewanjee S, Kandimalla R, Kalra RS, Valupadas C, Vallamkondu J, Kolli V et al.* COVID-19 and rheumatoid arthritis crosstalk: emerging association, therapeutic options and challenges. *Cells.* 2021;10(12):3291. DOI: 10.3390/cells10123291.
4. *Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP et al.* Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2020;34:101623. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101623.
5. *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. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20 (In Russ.).

6. *Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G.* Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(1):9–17. DOI: 10.1038/s41584-018-0109-2.
7. *Волошинова Е.В., Никитина Н.М., Смирнова Н.Д., Егорова Е.В.* Особенности течения АА амилоидоза при ревматоидном артрите на фоне инфекции COVID-19. *Клиническая нефрология.* 2021;2:72–75. DOI: 10.18565/nephrology.2021.2.72-75.
Voloshinova EV, Nikitina NM, Smirnova ND, Egorova EV. Features of the course of AA amyloidosis in rheumatoid arthritis against the background of COVID-19 infection. *Clinical Nephrology.* 2021;2:72–75 (In Russ.) DOI: 10.18565/nephrology.2021.2.72-75
8. *Kovács A, Cserenyecz A, Baksay B, Kemény É, Szekanecz Z.* Successful treatment of rheumatoid arthritis-associated renal AA amyloidosis with tocilizumab. *Isr Med Assoc J.* 2020;22(7):455–7. PMID: 33236574.
9. *Mikhaleva L, Gioeva Z, Varyasin V, Berezhnaja E, Vandysheva R, Gutyrchik N et al.* Pathomorphological features of the novel coronavirus disease in patients with systemic amyloidosis. *Biomedicines.* 2023;11(10):2811. DOI: 10.3390/biomedicines11102811.
10. *Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430–6. DOI: 10.1038/s41586-020-2521-4.
11. *Крылов М.Ю., Федоров Е.С., Салугина С.О.* Связь генетического полиморфизма острофазового маркера воспаления rs12218 гена *SAA1* с клиническими фенотипами ювенильного идиопатического артрита. *Современная ревматология.* 2021;15(2):23–28. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-2-23-28.
Krylov MYu, Fedorov ES, Salugina SO. Relationship of genetic polymorphism of the acute phase marker of inflammation rs12218 of the *SAA1* gene with clinical phenotypes of juvenile idiopathic arthritis. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2021;15(2):23–28 (In Russ.). DOI: 10.14412/1996-7012-2021-2-23-28.
12. *Zhou J, Dai Y, Lin Y, Chen K.* Association between serum amyloid A and rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2022;52:151943. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2021.12.011.
13. *Воробьева О.В., Романова Л.П.* Патоморфологические изменения органов при ревматоидном артрите со вторичным амилоидозом сердца и почек на фоне COVID-19. *Современная ревматология.* 2022;16(5):66–70. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-5-66-70.
Vorobeva OV, Romanova LP. Pathological changes in organs in rheumatoid arthritis with secondary amyloidosis of the heart and kidneys on the background of COVID-19. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2022;16(5):66–70 (In Russ.). DOI: 10.14412/1996-7012-2022-5-66-70.
14. *Haberman R, Axelrad J, Chen A, Castillo R, Yan D, Izmirly P et al.* Covid-19 in immune-mediated inflammatory diseases – case series from New York. *N Engl J Med.* 2020;383(1):85–8. DOI: 10.1056/NEJMc2009567.
15. *Гюева З.В., Вандышева Р.А., Бирюков А.Е., Селезнев Д.Е., Гутырчик Н.А., Мхитаров В.А. и др.* AL-амилоидоз тонкой кишки, осложнившийся массивным кровотечением. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского.* 2023;11(3):137–143. DOI: 10.33029/2308-1198-2023-11-3-137-143.
Gioeva ZV, Vandysheva RA, Biryukov AE, Seleznev DE, Gutyrchik NA, Mkhitarov VA et al. AL-amyloidosis of the small intestine complicated by massive bleeding. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky journal.* 2023;11(3):137–143 (In Russ.). DOI: 10.33029/2308-1198-2023-11-3-137-143.

Информация об авторе

Зарина Владиславовна Гюева – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая центральной патологоанатомической лабораторией НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Central Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-5456-8692>



Вячеслав Семенович Пауков (к 90-летию со дня рождения)

Vyacheslav Semenovitch Paukov on his 90th birthday

25 июня 2024 года исполнилось 90 лет Вячеславу Семеновичу Паукову – доктору медицинских наук, профессору, академику Российской академии естественных наук, члену Международной академии патологии. Вячеслав Семенович занимает достойное место в ряду отечественных патологоанатомов, пользуясь заслуженным уважением за огромный вклад, который он внес в специальность по линии научно-практической, педагогической и общественной деятельности. Его жизненный путь является достойным примером бескорыстного служения избранному делу.

В.С. Пауков родился в 1934 году в Нижнем Новгороде в семье рабочей интеллигенции. В 1937 году семья переехала в Подмоскowie, после войны – в Комсомольск-на-Амуре. В 1954 году Вячеслав Семенович переехал в Москву и поступил во 2-й Московский медицинский институт. В 1955 году поехал на освоение целинных земель в Казахстан в качестве комиссара студенческого строительного отряда. После окончания вуза в 1960 году В.С. Пауков работал хирургом в онкологической больнице МПС, где заразился инфекционной экземой, из-за чего был вынужден сменить профессию и занялся судебной медициной. Вначале работал экспертом в городском бюро, а с 1963 года в Центральной судебно-медицинской лаборатории Министерства обороны СССР у профессора М.И. Авдеева.

В 1964 году Вячеслав Семенович Пауков поступил в аспирантуру при кафедре патологической анатомии 1-го ММИ им. И.М. Сеченова под руководством академика РАМН А.И. Струкова, с которым его связывала творческая профессиональная деятельность до конца жизни великого учителя. Под руководством А.И. Струкова в 1966 году В.С. Пауков организовал одну из первых в нашей стране лабораторий электронной микроскопии, развивая новое научное направление – клеточную патологию. Основным предметом его научной работы стала патология сердца. В 1968 году для усовершенствования в электронной микроскопии А.И. Струков направил В.С. Паукова на пять месяцев на стажировку в ФРГ, в Гейдельбергский университет. В своей кандидатской диссертации «Ультраструктура гипертрофированного миокарда» (1968) В.С. Пауков показал роль митохондрий как основного источника энергии и выявил закономерности изменений

и восстановления их структуры при пороках сердца. В 1978 году он защитил докторскую диссертацию на тему «Ультраструктурные основы патологии сердца».

В 1980 году Вячеслав Семенович Пауков был избран заведующим кафедрой патологической анатомии 2-го лечебного факультета 1-го ММИ им. И.М. Сеченова. Кафедра располагалась на базе городской больницы № 7 (ныне ГКБ им. С.С. Юдина), и здесь же вместе с Вячеславом Семеновичем работали до конца жизни его учителя – академик А.И. Струков и профессор И.М. Кодолова. В 2010 году В.С. Пауков возглавил кафедру патологической анатомии Сеченовского университета, которую передал в 2016 году профессору Е.А. Коган, оставаясь почетным заведующим кафедрой, реорганизованной затем в Институт клинической медицины и цифровой патологии.

Научные интересы Вячеслава Семеновича Паукова чрезвычайно широки, включают в себя помимо ультраструктурной патологии сердца патологию алкогольной болезни, тонкие механизмы воспаления, ряд вопросов общей патологии. Он автор более чем 380 научных публикаций, ряда научных руководств, монографий, учебников, учебных пособий. Под его руководством защищены 10 докторских и 20 кандидатских диссертаций. В.С. Пауков является членом редколлегии журнала «Клиническая и экспериментальная морфология», много лет возглавлял совет старейшин Российского общества патологоанатомов. Со стороны государства его заслуги отмечены высоким званием Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, тремя орденами, восемью медалями, знаком «Отличнику здравоохранения». Вячеслав Семенович Пауков – один из ведущих лидеров и гордость отечественной патологической анатомии. Глубокое уважение вызывают его личностные качества – доброжелательность, искренность, принципиальность, безусловная порядочность, широта кругозора и неутомимое трудолюбие.

Коллектив Научно-исследовательского института морфологии человека и редакционная коллегия журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» поздравляют Вячеслава Семеновича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, творческой энергии, любви родных, близких, коллег и друзей.