

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 13 | № 4 | 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 **4** | 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:

70045 according
to the “Ural-Press” agency catalog

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

The mass media registration
certificate III № ФС77-83521
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

М.А. Козлова, Д.А. Арешидзе, Л.М. Михалева
Вирус-индуцированные новообразования
человека и роль трансмиссионной электронной
микроскопии в их диагностике

5

M.A. Kozlova, D.A. Areshidze, L.M. Mikhaleva
Virus-induced human cancers and the role of
transmission electron microscopy in their diagnosis

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH

*Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева, М.А. Соборов,
С.В. Гарманов, М.Б. Кокоев, В.А. Мироненко,
Р.А. Серов*
Сравнительный анализ изменений морфологии
стенки восходящей аорты у пациентов
с двустворчатым и трехстворчатым аортальным
клапаном при ее аневризме

18

*T.V. Sukhacheva, E.V. Penyaeva, M.A. Soborov,
S.V. Garmanov, M.B. Kokoev, V.A. Mironenko,
R.A. Serov*
Comparative analysis of morphological changes in the
wall of the ascending aorta in patients with bicuspid
and tricuspid aortic valves in aortic aneurysm

*N.K. Shakhpazyan, L.M. Mikhaleva, N.K. Sadykhov,
A.L. Bedzhanyan, Z.V. Gioeva, A.I. Mikhalev,
V.V. Pechnikova, K.Yu. Midiber, A.N. Orekhov*
Altered proinflammatory cytokine response
in colorectal cancer patients: insights into immune
dysregulation

29

*Н.К. Шахпазян, Л.М. Михалева, Н.К. Садыхов,
А.Л. Беджанян, З.В. Гюева, А.И. Михалев,
В.В. Печникова, К.Ю. Мидибер, А.Н. Орехов*
Измененный провоспалительный цитокиновый
ответ у пациентов с колоректальным раком
как признак иммунной дисрегуляции

*И.А. Недорубова, В.О. Черномырдина, А.Ю. Меглей,
В.П. Басина, В.С. Кузнецова, А.В. Васильев,
Т.Е. Григорьев, Ю.Д. Загоскин, С.Н. Чвалун,
Д.В. Гольдштейн, Т.Б. Бухарова*
Влияние ибупрофена на остеогенные свойства
матриц, несущих аденовирусные конструкции
с геном *BMP2*

36

*I.A. Nedorubova, V.O. Chernomyrdina, A.Yu. Meglei,
V.P. Basina, V.S. Kuznetsova, A.V. Vasilyev,
T.E. Grigoriev, Yu.D. Zagoskin, S.N. Chvalun,
D.V. Goldshtein, T.B. Bukharova*
Effect of ibuprofen on osteogenic properties of matrices
carrying adenovirus with the *BMP2* gene

*А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, Е.К. Ивлева,
Е.В. Спиридонова, В.В. Омигов, О.В. Пьянков,
О.С. Таранов*
Патоморфологические изменения в легких
морской свинки при моделировании инфекции,
вызванной различными генетическими
вариантами вируса SARS-CoV-2

47

*A.V. Shipovalov, G.A. Kudrov, E.K. Ivleva,
E.V. Spiridonova, V.V. Omigov, O.V. Pyankov,
O.S. Taranov*
Pathomorphological changes in lung tissue of guinea
pigs in SARS-CoV-2 infection model

С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов
Сканирующая электронная микроскопия легких крыс при блеомициновом фиброзе

58 S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov
Scanning electron microscopy of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

И.А. Хуторская, Г.Ф. Шаймарданова, В.П. Балашов, В.Н. Абрамов, А.В. Балашов, Е.В. Быстрова, И.А. Евстифеева
Морфология скелетных мышц при динамической физической нагрузке и коррекции L-карнитином

67 I.A. Khutorskaya, G.F. Shaymardanova, V.P. Balashov, V.N. Abramov, A.V. Balashov, E.V. Bystrova, I.A. Evstifeeva
Morphology of skeletal muscles under dynamic exercise and correction with L-carnitine

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

Н.В. Низяева, И.А. Куликов, Т.Н. Белоусова, К.А. Артемьева, А.П. Милованов, Н.Б. Тихонова, Т.В. Фокина, Е.Р. Милютина, Е.И. Боровкова, И.А. Гейлис, Ю.Е. Доброхотова, Л.М. Михалева
Placenta percreta: placental villous invasion or a form of adhesive disease?

76 Н.В. Низяева, И.А. Куликов, Т.Н. Белоусова, К.А. Артемьева, А.П. Милованов, Н.Б. Тихонова, Т.В. Фокина, Е.Р. Милютина, Е.И. Боровкова, И.А. Гейлис, Ю.Е. Доброхотова, Л.М. Михалева
Placenta percreta: плацентарная ворсинчатая инвазия или вариант спаечной болезни?

Е.Л. Казачков, М.К. Лебедева, Д.В. Гоголева, Г.В. Сычугов, Э.А. Казачкова, Ю.А. Медведева, А.А. Дуб
Фиброэпителиальный стромальный полип вульвы с атипичными клетками, ассоциированный с беременностью

86 E.L. Kazachkov, M.K. Lebedeva, D.V. Gogoleva, G.V. Sychugov, E.A. Kazachkova, U.A. Medvedeva, A.A. Dub
Fibroepithelial stromal polyp of the vulva with atypical cells associated with pregnancy

ХРОНИКА EVENTS

XIV пленум Российского общества патологоанатомов

92 XIV Plenum of the Russian Society of Pathologists

Научно-познавательный фестиваль «МЕДИКФЕСТ»

Scientific and educational festival "MEDIKFEST"

Вирус-индуцированные новообразования человека и роль трансмиссионной электронной микроскопии в их диагностике

М.А. Козлова, Д.А. Арешидзе, Л.М. Михалева

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

Резюме. Одним из важных канцерогенных факторов, и при этом чрезвычайно сложным в плане изучения, являются онкогенные вирусы. В данном обзоре рассмотрены основные исторические этапы изучения вирусной онкопатологии в клинике и эксперименте, приведена краткая классификация онкогенных вирусных инфектов, дана характеристика их участия в канцерогенезе. Описана роль методов электронной микроскопии в диагностике онкологических заболеваний как в практическом здравоохранении, так и в научно-исследовательском аспекте, а также охарактеризованы перспективы развития применения данного метода в изучении ультраструктурных морфологических особенностей вирус-индуцированных опухолей в настоящее время. Морфологическое исследование клетки методами электронной микроскопии позволяет установить характерные ультраструктурные паттерны для каждой патологии и их вариации внутри нозологической единицы. Применение возможностей электронной микроскопии в комплексе с другими современными методами разностороннего мультидисциплинарного исследования характеристик организма пациентов с вирус-индуцированной онкопатологией открывает горизонты для понимания корреляционных связей гомеостатических, адаптационных, патологических процессов, генетических, средовых и, как следствие, морфологических предпосылок развития и особенностей течения тех или иных заболеваний.

Ключевые слова: электронная микроскопия, вирусная онкопатология, канцерогенез, социально значимая патология

Для корреспонденции: Мария Александровна Козлова. E-mail: kma-morph@mail.ru

Для цитирования: Козлова М.А., Арешидзе Д.А., Михалева Л.М. Вирус-индуцированные новообразования человека и роль трансмиссионной электронной микроскопии в их диагностике. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):5–17. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.5-17.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (№ FURG-2024-0027-124021600057-0).

Статья поступила 20.05.2024. Получена после рецензирования 04.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Virus-induced human cancers and the role of transmission electron microscopy in their diagnosis

M.A. Kozlova, D.A. Areshidze, L.M. Mikhaleva

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

Abstract. Oncogenic viruses are one of the important carcinogenic factors being extremely complicated to study. This review gives the main historical stages of clinical and experimental study of viral oncopathology, provides basic classification of oncogenic viral infections, and characterizes their role in carcinogenesis. We describe the role of electron microscopy methods in diagnosing oncological diseases in both practical healthcare and research. The article also discusses future possible uses of electron microscopy in studying ultrastructural morphological features of virus-induced tumors. Morphological examination of cells using electron microscopy methods allows to establish characteristic ultrastructural patterns for each pathology and their variations within the nosological form. The use of electron microscopy in combination with other modern methods for a comprehensive multidisciplinary study of patients with virus-induced oncopathologies opens up new horizons for understanding the correlations of homeostatic, adaptive, and pathological processes as well as genetic, environmental, and, thus, morphological prerequisites for the development and course of various diseases.

Keywords: electron microscopy, viral oncopathology, carcinogenesis, social pathology

Corresponding author: Maria A. Kozlova. E-mail: kma-morph@mail.ru

For citation: Kozlova M.A., Areshidze D.A., Mikhaleva L.M. Virus-induced human cancers and the role of transmission electron microscopy in their diagnosis. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(4):5–17 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.5-17.

Funding. The work 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. FURG-2024-0027-124021600057-0).

Received 20.05.2024. **Received in revised form** 04.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Проблема этиологии опухолевых процессов волновала врачей и ученых во все времена. Основопологающей для современных представлений об этом процессе можно считать теорию раздражения, сформулированную в 1853 году Рудольфом Вирховом, согласно которой опухолевые клетки образуются из здоровых клеток организма вследствие воздействия повреждающих (раздражающих) внешних факторов [1]. Последующие теории канцерогенеза развивали эту идею, основываясь на открытии того или иного канцерогенного фактора.

К настоящему времени разнообразная и многофакторная этиология опухолевых заболеваний не вызывает сомнений. Для канцерогенеза требуется сочетание множества факторов. Изменение клеточного генома после воздействия канцерогенов может вызвать злокачественную трансформацию, если одновременно происходит подавление апоптоза и нарушение иммунного ответа, приводящее к неспособности распознать и уничтожить злокачественную клетку. Одним из важных канцерогенных факторов и при этом чрезвычайно сложным в плане изучения является инфекционный. И если бактериальные и паразитарные инфекции оказывают косвенное действие на частоту возникновения опухолей в основном за счет развития хронических воспалительных процессов или же повторяющейся интоксикации и травматизации тканей [2], то онкогенные вирусы обладают способностью к непосредственной трансформации клеток. Большинство из них интегрируется в геном клетки-хозяина и способно иммортализировать ее в целях обеспечения собственной беспрепятственной репликации [3].

Целью данного обзора являются представление исторического аспекта изучения вирусной онкопатологии в клинике и эксперименте, краткая классификация онкогенных вирусов, характеристика их роли в канцерогенезе, обобщенное описание роли электронной микроскопии в диагностике онкологических заболеваний (как в практическом здравоохранении, так и в научно-исследовательском аспекте), а также перспективы применения данного метода в изучении ультраструктурных морфологических особенностей вирус-индуцированных опухолей.

История изучения этиологической роли вирусов в канцерогенезе

Первое подтверждение вирусной этиологии опухолей было получено в 1907 году, когда итальянский

врач Джузеппе Чиуффо и соавторы обнаружили, что бородавки человека могут передаваться посредством нанесения на здоровую кожу бесклеточных фильтратов из клеток данного новообразования. Через 70 лет была подтверждена роль папилломавируса в развитии рака у человека. В 1908 году о возможности аналогичной передачи лейкемии у кур доложили В. Эллерман и О. Банг, а в 1911 году П. Раус показал возможность бесклеточного заражения здоровых птиц веретеночной саркомой также при помощи бесклеточных экстрактов опухоли [4]. Эти исследования легли в основу вирусной теории канцерогенеза. В 1966 году Пейтону Раусу была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине [5]. В дальнейшем были проведены исследования на широком спектре различных опухолей животных, подтвердившие наличие неопухолевых агентов, провоцирующих развитие опухолей [6–13].

Поиски онкогенных вирусов человека долго не давали отчетливых воспроизводимых результатов, несмотря на то, что в их процессе было показано, что аденовирусы человека могут провоцировать развитие опухолей у животных [14].

Накопление знаний об онкогенных вирусах, и в особенности о морфологических проявлениях их активности в системе вирус–клетка, является в значительной мере нетривиальной задачей. Онкогенные вирусы могут осуществлять свой вклад на разных этапах онкогенеза, степень их вклада в развитие итогового заболевания варьирует, по разным данным, от 15 до 100% [15]. Необходимо заметить, что ни для одного из онкогенных вирусов запуск опухолевой трансформации не является неотъемлемой частью его жизненного цикла. Все известные онкогенные вирусы могут передаваться и вызывать инфекционные заболевания без инициации развития неоплазий. В нормальных условиях инфицированная клетка реагирует на инфекцию, иницируя остановку клеточного цикла и запуская процесс запрограммированной гибели; при этом с большой долей вероятности элиминируется и злокачественная клетка. Таким образом, вполне вероятно, что вирусные онкогены также служат генами уклонения от иммунного ответа, которые не позволяют клетке-хозяину иницировать эти стереотипные ответы на инфекцию [16, 17]. Вероятность развития неоплазий при инфицировании в значительной мере связана как с наследственной предрасположенностью к тем или иным видам рака, так и с сочетанным действием различных факторов внутренней и внешней среды, усугубляющих эффекты вируса

(хроническое воспаление, гормональные воздействия, лучистая энергия солнца, воздействие химических веществ, рентгеновское излучение, диета с низким содержанием клетчатки, курение, алкоголь и др.) [18–20]. При этом влияние нескольких факторов на риск может иметь характер как аддитивный, так и мультипликативный, то есть может соответствовать сумме рисков данных факторов или же произведению их рисков [21] (рис. 1).

Вирусный канцерогенез во многих случаях ассоциирован с непродуктивной инфекцией, находящейся длительное время в латентной форме, при которой зачастую не удастся выделить из опухоли возбудитель заболевания или обнаружить его морфологическими методами [22–25]. В таких случаях подтверждение вирусной природы заболевания является нелегкой задачей. Для решения данной проблемы специалистами в разное время предложены следующие критерии оценки [26].

Эпидемиологические

- Географическая распространенность рассматриваемой вирусной инфекции должна соответствовать таковой для предположительно ассоциированного типа рака, с поправкой на наличие известных сопутствующих факторов.
- Уровень определяемых вирусных маркеров выше у носителей заболевания, чем у представителей методически верно подобранной контрольной группы.

- Наличие вирусных маркеров предшествует развитию опухоли; развитие опухолей происходит чаще у пациентов с вирусными маркерами, чем в их отсутствие.
- Частота возникновения опухолевого заболевания снижается за счет профилактики ассоциированной вирусной инфекции.

Вирусологические

- Вирус способен к опухолевой трансформации целевых клеток *in vitro*.
- Вирусный геном идентифицируется в опухолевых клетках, отсутствуя при этом в нормальных.
- Инфицирование вирусом индуцирует развитие опухолей у животных в опыте.

Статистические

- Сила связи (как часто вирус ассоциирован с опухолью).
- Последовательность (наблюдалась ли взаимосвязь неоднократно).
- Специфичность ассоциации (является ли вирус однозначно ассоциированным с опухолью).
- Временные взаимоотношения (предшествует ли вирусная инфекция канцерогенезу).
- Биологический градиент (существует ли зависимость вероятности развития опухоли от величины вирусной нагрузки).

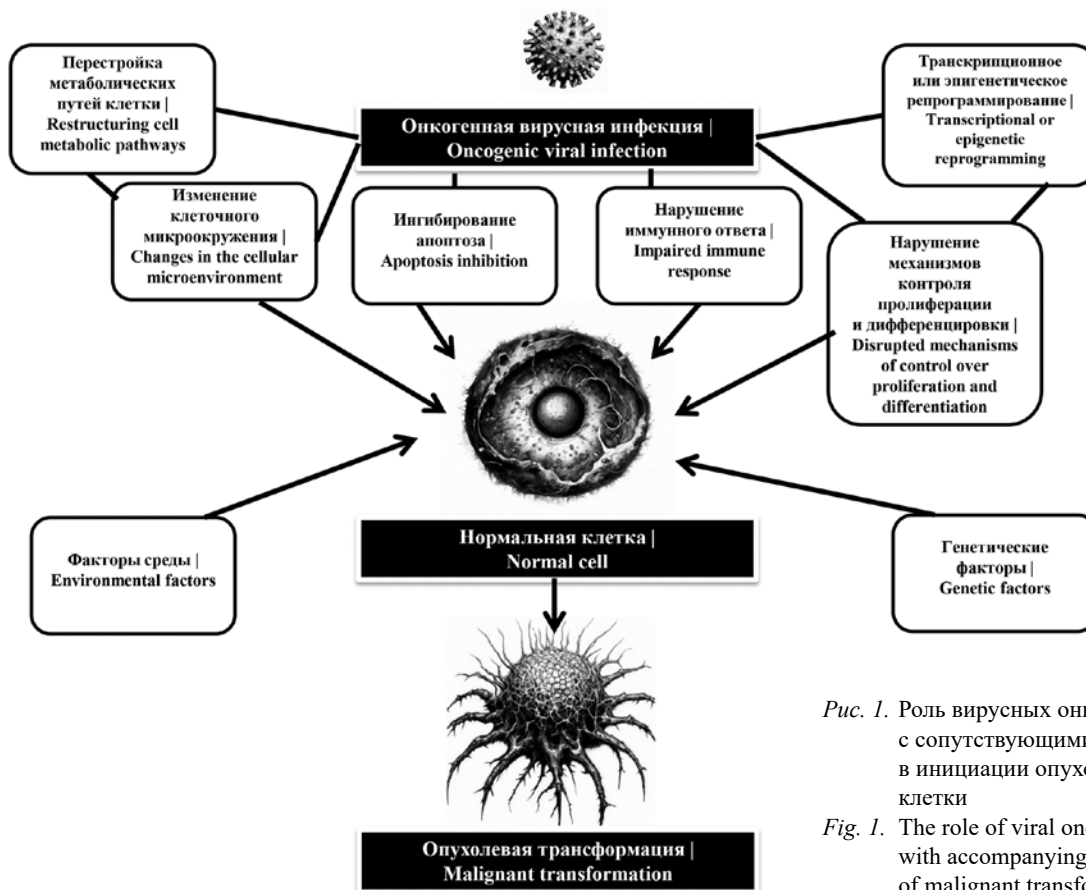


Рис. 1. Роль вирусных онкогенов в сочетании с сопутствующими факторами в инициации опухолевой трансформации клетки
 Fig. 1. The role of viral oncogenes in combination with accompanying factors in the initiation of malignant transformation

- Биологическая достоверность (правдоподобна ли с биологической точки зрения вероятность индукции опухолевого роста данным вирусом).
- Согласованность (имеет ли предполагаемая связь смысл с точки зрения известных характеристик опухоли).
- Экспериментальные данные (есть ли лабораторные данные, подтверждающие взаимосвязь) [27, 28].

К настоящему времени онкогенное действие подтверждено для семи вирусов человека, принадлежащих к разным семействам. Среди этого числа присутствуют два семейства РНК-вирусов, к которым относятся вирус гепатита С и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (семейства *Flaviviridae* и *Retroviridae*, соответственно), и пять разновидностей ДНК-вирусов: вирус Эпштейна–Барр и герпес-вирус саркомы Капоши (*Herpesviridae*), вирус гепатита В (*Hepadnaviridae*), вирус папилломы человека (*Papillomaviridae*) и полиомавирус клеток Меркеля (*Polyomaviridae*). Этиологическая связь данных инфектов с канцерогенезом у человека подтверждена клинически и экспериментально, они классифицированы экспертами Международного агентства по изучению рака как канцерогенные для человека (группа 1). Помимо достоверно подтвержденных в клинике и опыте этиологических связей данных вирусов с определенными типами рака существуют основания для внесения ряда онкологических патологий в список вероятно ассоциированных с теми же возбудителями и их дальнейшего всестороннего изучения. Важно отметить значительную распространенность и высокую социальную значимость данных патологий, в особенности затрагивающих репродуктивную функцию и передающихся в родах от матери ребенку [29–34] (табл. 1).

Доля опухолей человека вирусного происхождения варьирует в достаточно широком диапазоне, демонстрируя высокие значения (20–25%) в развивающихся странах Юго-Восточной Азии и Африки и относительно низкие (5%) в развитых странах [35, 36].

Как уже было упомянуто, вирусы с подтвержденным онкогенным действием относятся к разным семействам, однако в большинстве своем обладают относительно схожим морфологическим строением.

Вирус Эпштейна–Барр (EBV) по своему строению является типичным герпесвирусом. Незрелая частица (нуклеокапсид) вируса Эпштейна–Барр представляет собой икосаэдр с шестиугольным профилем, имеет диаметр около 80 нм и либо пуста, либо содержит в своем центре электронноплотный кольцеобразный нуклеоид. Зрелый вирион данного вируса в разрезе демонстрирует дополнительную внешнюю оболочку размером около 120 нм и всегда содержит электронноплотный центрально расположенный нуклеоид диаметром около 45 нм [37, 38] (рис. 2 А).

Вирус гепатита В (HBV) – один из самых маленьких оболочечных вирусов животных. Вирионы размером 30–42 нм, способные инфицировать гепатоциты, называют частицами Дейна. Такой вирион состоит из ико-

саэдрического белкового нуклеокапсида, внешней липидной оболочки и ядра (нуклеоида). Нуклеокапсид содержит вирусную ДНК и ДНК-полимеразу, обладающую активностью обратной транскриптазы. Внешняя оболочка обладает встроенными белками, которые участвуют в связывании вирусов и проникновении в чувствительные клетки. Помимо частиц Дейна в сыворотке крови инфицированных пациентов методами электронной микроскопии обнаруживаются в большом количестве нитевидные, сферические и змеевидные (cobra-shaped) тела без ядра. Эти частицы не являются инфекционными и состоят из белков поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), обильно вырабатываемого в течение жизненного цикла вируса [39, 40] (рис. 2 В).

Диаметр сферических вирионов вируса гепатита С (HCV) составляет от 50 до 80 нм, они состоят из липопротеиновой оболочки и нуклеокапсида, содержащего одноцепочечный РНК-геном, ядро, гликопротеины E1 и E2 и трансмембранные белки I типа, которые образуют ковалентные связи с инфицированными гепатоцитами [41, 42] (рис. 2 С).

Вирионы вируса герпеса человека 8-го типа (герпес-вируса саркомы Капоши) состоят из гексагональных по форме нуклеокапсидов диаметром около 110 нм, окруженных белковым тегументом и липопротеиновой оболочкой и содержащих нуклеоиды круглой, многоугольной или столбчатой формы [43, 44] (рис. 2 D).

Вирионы Т-лимфотропного вируса человека первого типа (HTLV-I) преимущественно сферические, неоднородны по размеру и имеют средний диаметр 113 ± 23 нм. Вирионы обладают неупорядоченной полиэдрической структурой капсидного ядра, различной в каждой вирусной частице независимо от ее величины. Размеры нуклеоидов также варьируют, при этом некоторые участки белкового нуклеокапсида повторяют изгиб внутреннего листка липидной оболочки вируса, в то время как другие его части полностью отделены от вирусной мембраны [45, 46] (рис. 2 E).

Под общим названием «вирус папилломы человека» (HPV) объединено, по разным классификациям, порядка 30 вирусов, относящихся к пяти родам. ВПЧ относятся к безоболочечным вирусам, то есть обладают простым икосаэдрическим капсидом диаметром 40–55 нм, содержащим двухцепочечную ДНК в виде замкнутого кольца, включающего в себя около 8000 нуклеотидных пар [47–49] (рис. 2 F).

Вирион полиомавируса клеток Меркеля (MCPyV) представляет собой небольшую неоформленную безоболочечную двуцепочечную ДНК-содержащую (dsDNA) вирусную частицу икосаэдрической формы диаметром 45–50 нм. Структура MCPyV во многом схожа с таковой у других полиомавирусов [50, 51] (рис. 2 G).

Помимо упомянутых вирусов с подтвержденным онкогенным действием пристальное внимание клиницистов и исследователей длительное время направ-

Таблица 1 | Table 1

Онкогенные вирусы человека | Oncogenic human viruses

| Наименование Name | Число случаев в мире/год Number of cases in the world/year | Классификация Classification | Клеточный тропизм Cell tropism | Первичное заболевание Primary disease | Подтвержденно ассоциированные типы рака у человека Confirmed associated types of cancer in humans | Предполагаемо ассоциированные типы рака у человека Suspected associated types of cancer in humans |
|---|--|--------------------------------|--|--|---|---|
| Вирус Эпштейна–Барр Epstein–Barr virus (EBV) | 200 тыс. 200,000 | <i>Herpesviridae</i> | Эпителиальные клетки ротоглотки, В-клетки Oral epithelial cells, B cells | Асимптоматическое носительство, инфекционный мононуклеоз, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (синдром Дункана) Asymptomatic carrier, infectious mononucleosis, X-linked lymphoproliferative disease (Duncan syndrome) | Лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, ассоциированная с иммуносупрессией, экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, аденокарцинома желудка, лейомиосаркомы Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma associated with immunosuppression, extranodal NK/T-cell lymphoma, gastric adenocarcinoma, leiomyosarcomas | Лимфоэпителиома-подобная карцинома Lymphoepithelioma-like carcinoma |
| Вирус гепатита В Hepatitis B virus (HBV) | 420 тыс. 420,000 | <i>Heradnaviridae</i> | Гепатоциты, лейкоциты Hepatocytes, leucocytes | Асимптоматическое носительство, острый гепатит, хронический гепатит, цирроз печени Asymptomatic carrier, acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis | Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma | Холангиокарцинома, неходжкинская лимфома Cholangiocarcinoma, non-Hodgkin lymphoma |
| Т-лимфотропный вирус человека первого типа Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) | 3 тыс. 3,000 | <i>Retroviridae</i> | Т-клетки T cells | | Т-клеточная лимфома/лейкемия взрослых Adult T-cell lymphoma/leukemia | |
| Вирус папилломы человека Human papillomavirus (HPV) | 640 тыс. 640,000 | <i>Papillomaviridae</i> | Сквамозный эпителий Squamous epithelium | | Карцинома шейки матки, вульвы, влагалища, полового члена, анального канала, ротовой полости, ротоглотки и миндалин Carcinomas of the cervix, vulva, vagina, penis, anal canal, oral cavity, oropharynx, and tonsils | Рак гортани, некоторые опухоли головы и шеи Laryngeal cancer, some head and neck tumors |

Таблица 1 (окончание) | Table 1 (end)

| Наименование Name | Число случаев в мире/год Number of cases in the world/year | Классификация Classification | Клеточный тропизм Cell tropism | Первичное заболевание Primary disease | Подтвержденно ассоциированные типы рака у человека Confirmed associated types of cancer in humans | Предполагаемо ассоциированные типы рака у человека Suspected associated types of cancer in humans |
|--|--|--------------------------------|----------------------------------|---|---|---|
| Вирус гепатита С Hepatitis C virus (HCV) | 170 тыс. 170,000 | <i>Flaviviridae</i> | Гепатоциты Hepatocytes | Асимптоматическое носительство, острый гепатит, цирроз печени Asymptomatic carriage, acute hepatitis, liver cirrhosis | Гепатоцеллюлярная карцинома, неходжкинская лимфома Hepatocellular carcinoma, non-Hodgkin lymphoma | Холангиокарцинома Cholangiocarcinoma |
| Вирус герпеса человека 8-го типа (герпес-вирус саркомы Капоши) Human Herpesvirus-8 (Kaposi sarcoma Herpesvirus [KSHV]) | 44 тыс. 44,000 | <i>Herpesviridae</i> | В-клетки B cells | | Саркома Капоши, первичная выпотная лимфома Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma | Мультицентрическая болезнь Кастлемана Multicentric Castlemann disease |
| Полиомавирус клеток Меркеля Merkel cell polyomavirus (MCPyV) | 10 тыс. 10,000 | <i>Polyomaviridae</i> | Клетки Меркеля Merkel cells | Асимптоматическое носительство Asymptomatic carriage | Карцинома Меркеля Merkel cell carcinoma | |

лено на ряд ДНК- и РНК-вирусов, свойства которых позволяют также предположить у них потенциальное канцерогенное действие [52–55] (табл. 2).

Особняком в списке вирусов, относящихся к онкогенным, стоит вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Это обусловлено тем, что сам по себе данный вирус

не вызывает опухолевой трансформации клеток. Тем не менее вызываемый им критический иммунодефицит значительно повышает частоту инфицирования онкогенными вирусами; при этом течение данных заболеваний на фоне ВИЧ-инфекции отличается высокой агрессивностью, тенденцией к ускоренному росту

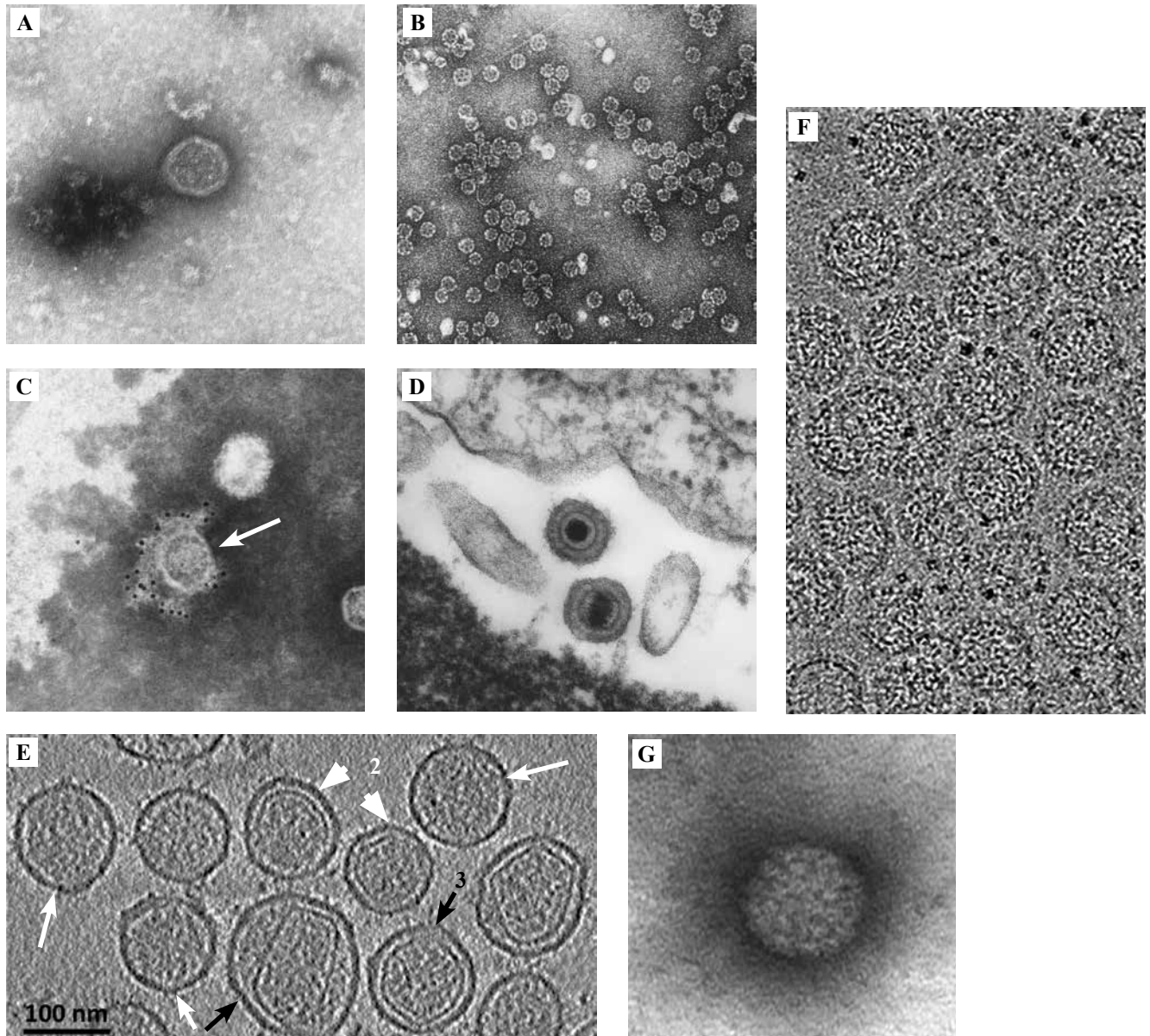


Рис. 2. Изображения онкогенных вирусов, полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии.

А – вирус Эпштейна–Барр, В – вирус гепатита В, С – вирус гепатита С (стрелка указывает на нуклеоид вирусной частицы), D – вирус герпеса человека 8-го типа (герпес-вирус саркомы Капоши), E – Т-лимфотропный вирус человека первого типа (белые стрелки указывают на вирионы с равномерно распределенной электронной плотностью, не имеющие выраженных сердцевин; черные стрелки указывают на вирионы со зрелым нуклеоидом; белые головки стрелок указывают на частицы с недостаточно зрелым нуклеоидом; частица 3 имеет сферическое капсидное ядро), F – вирус папилломы человека, G – полиомавирус клеток Меркеля

Fig. 2. Images of oncogenic viruses obtained with transmission electron microscopy.

A – Epstein–Barr virus, B – hepatitis B virus, C – hepatitis C virus (the arrow indicates the nucleoid of the viral particle), D – human herpesvirus-8 (Kaposi sarcoma herpesvirus), E – human T-lymphotropic virus type 1 (white arrows indicate virions with uniformly distributed electron density and no pronounced core; black arrows indicate virions with a mature nucleoid; white arrowheads indicate particles with a partially mature nucleoid; particle 3 has a spherical capsid core), F – human papillomavirus, G – Merkel cell polyomavirus

Вирусы человека с предполагаемым онкогенным действием | Human viruses with putative oncogenic effects

| Наименование Name | Классификация Classification | Предполагаемо ассоциированные опухоли Suspected associated tumors |
|---|--------------------------------|---|
| Обезьяний вакуолизирующий вирус SV40 Macaca mulatta polyomavirus 1 | <i>Polyomaviridae</i> | Злокачественные новообразования головного мозга, рак кости, мезотелиома Brain cancer, bone cancer, mesothelioma |
| Полиомавирус человека 1 Human polyomavirus 1 (BK virus) | <i>Polyomaviridae</i> | Рак простаты Prostate cancer |
| Вирус Джона Каннингема John Cunningham virus (JC virus) | <i>Polyomaviridae</i> | Злокачественные новообразования головного мозга Brain cancer |
| Эндогенные ретровирусы человека Human endogenous retroviruses (HERV) | <i>Retroviridae</i> | Герминогенные опухоли, рак молочной железы, рак яичников и меланома Germ cell tumors, breast cancer, ovarian cancer and melanoma |
| Вирус опухоли молочной железы человека Human mammary tumor virus (HMTV) | <i>Retroviridae</i> | Рак молочной железы Breast cancer |
| Гепатит TTV Torque teno virus (TTV) | <i>Circoviridae</i> | Опухоли желудочно-кишечного тракта, легких, молочной железы, миелома Tumors of the gastrointestinal tract, lungs, and breast, myeloma |

и метастазированию, значительно хуже поддаваясь противоопухолевой терапии, чем у лиц, не инфицированных ВИЧ [56–59].

Роль электронной микроскопии в изучении и диагностике вирус-индуцированных опухолевых процессов

Ключевую роль в зарождении современной вирусной цитопатологии в целом и вирусной онкопатологии как ее подраздела сыграли создание и развитие в XX веке метода электронной микроскопии, позволившего значительно расширить познания об ультраструктуре опухолей, онкогенных вирусах и их поведении в клетке.

При изучении вирус-индуцированных опухолей на светооптическом уровне, ограниченном разрешающей способностью светового микроскопа, невозможно было составить отчетливое представление об ультраструктурных преобразованиях органоидов опухолевых клеток, в том числе под действием вирусных инфекций, о структуре онкогенных вирусов человека, их поведении в клетке и других морфологических аспектах данных патологий.

Переломным моментом в развитии онкопатологии стало открытие Майклом Эпштейном и Ивонной Барр вирусных частиц вируса герпеса человека 4-го типа в клетках лимфомы Беркитта с помощью просвечивающей электронной микроскопии [60–62]. За этим открытием последовало широкомасштабное изучение тонкой структуры различных опухолей человека и животных, создавшее фундамент для большинства наших современных представлений об опухолевом росте, а также метаболических и структурных преобразованиях в клетке и ткани, характере опухолевого неопластического, что, несомненно, стало чрезвычайно значимой

ступенью для понимания этиологии и патогенеза не только вирус-индуцированного, но и неинфекционного канцерогенеза [63, 64].

Вирус при внутриклеточном паразитировании выражено нарушает, извращает метаболические процессы в клетке, что проявляется в изменениях ее ультраструктурной организации. Эти изменения распространяются как на отдельные органоиды клетки, так и на системы гомологичных органоидов или же на всю клетку в целом. Характер и последовательность деструктивных изменений зависят от особенностей онтогенеза конкретного вируса, чувствительности клетки к инфекту, выраженности вирусной нагрузки и ряда прочих причин. Таким образом, методами электронной микроскопии можно установить характерные ультраструктурные паттерны для каждой патологии и их вариации внутри нозологической единицы [65].

Длительное время электронная микроскопия служила одним из основных инструментов диагностики опухолевых процессов. До развития и повсеместного внедрения методов молекулярно-генетической диагностики в клинической и экспериментальной онкологии именно ультраструктурное исследование с помощью просвечивающих электронных микроскопов позволяло наиболее точно верифицировать диагноз и обеспечить соответствующую ему терапию [66, 67].

Разумеется, у данного метода имеются свои ограничения, наиболее значимым из которых является, конечно, его длительность. В отличие от гистологических методов, допускающих срочную диагностику на замороженных и заключенных в парафин образцах, классическая пробоподготовка материала для просвечивающей электронной микроскопии занимает до двух недель, которые для пациента в тяжелом состоянии могут оказаться критическими. С учетом этого в настоящее

время электронная микроскопия отчасти уступает свои диагностические позиции более быстрым и удобным в использовании методикам (ПЦР, гистологическим, в том числе иммуногистохимическим методам, и т.д.), однако приобретает дополнительное значение в качестве важного инструмента исследований [68–73]. Тем не менее, существуют доступные для опытного специалиста методы ускоренной проводки биологических образцов, при которых срезы могут быть готовы к просмотру в течение 2,5–3 часов. Для подобной проводки образцы ткани нарезаются очень тонко (порядка 0,5 мкм), продолжительность пребывания в обезживающих растворах уменьшается, а полимеризация блока проводится при более высокой температуре в течение более короткого времени (например, 25 минут при +95°C). Кроме того, появление микроволновой обработки также позволило сократить время, необходимое для окрашивания, обезживания и заливки образцов [74–76].

Для ускоренной идентификации патогенов в диагностической электронномикроскопической вирусологии широко применяется метод негативного контрастирования. Данная техника, внедренная в 1959 году Р. Хорном и С. Бреннером, использует способность солей тяжелых металлов рассеивать электроны для контрастирования вирусов или бактерий, что позволяет детально изучить поверхность объекта. Удобство и простота метода обеспечивают возможность проводить рутинное исследование большого количества образцов. Одним из наиболее часто используемых негативных контрастов в диагностической электронной микроскопии является фосфорно-вольфрамовая кислота, но есть и другие, которые применяются регулярно (например, молибдат аммония, уранилацетат, соли кремневольфрамовой кислоты). Очищенную суспензию вируса в буферном растворе инактивируют, центрифугируют и пропускают через фильтры до достижения необходимой концентрации. Раствор контрастирующего вещества либо смешивают с суспензией вируса перед нанесением на сетку, либо наносят на сетку после того, как образец адсорбировался на опорной пленке [77].

Минус методики негативного контрастирования – возможное искажение формы вирионов вследствие поверхностного натяжения при высушивании образца на сетке. Современным методом, позволяющим избежать подобных повреждений и добиться получения точных изображений тонкой структуры различных объектов, является криоэлектронная микроскопия. Ограничения данного метода включают необходимость в высокоспециализированном дорогостоящем оборудовании и тщательную пробоподготовку. Образцы при использовании данной методики замораживают в жидком азоте, переносят в микроскоп в специальной холодильной камере и рассматривают в замороженном виде в специальном трансмиссионном электронном микроскопе, оснащенном криостативом. Многие цифровые изображения делаются под разными углами наклона и реконструируются компьютером в трехмерное изображение.

Цифровая визуализация также позволяет окрашивать различные компоненты изображения для получения наглядных иллюстраций строения тех или иных биологических объектов [78, 79]. Сочетание возможностей электронной микроскопии с другими современными методами комплексного разностороннего исследования характеристик организма пациента с вирус-индуцированной онкопатологией открывает горизонты для понимания корреляционных связей гомеостатических, адаптационных, патологических процессов, генетических, средовых и, как следствие, морфологических предпосылок развития и особенностей течения тех или иных заболеваний.

Методы электронной микроскопии позволяют

- Визуализировать наличие/отсутствие активных форм вирусов в клетках опухолей и/или при предопухоловом состоянии тканей, а также в культурах клеток в клинике и эксперименте.
- При визуализации активных инфекционных агентов определять области их локализации в клетке и внеклеточном матриксе, устанавливать характер взаимодействия вирусов с органоидами клетки и элементами тканевого микроокружения.
- Устанавливать качественные и количественные ультраструктурные особенности клеток, их органоидов (описательная и/или морфометрическая характеристика органоидов – форма, количество, локализация, признаки повышенной или сниженной функциональной активности клетки, наличие или отсутствие признаков внутриклеточной регенерации).
- Определять дистрофические и дегенеративные изменения в клетке.
- Оценивать характер васкуляризации опухоли.
- Составлять характеристику морфологической картины иммунного ответа.
- Определять типы клеточной гибели (некроз, апоптоз, пироптоз, ферроптоз).
- Определять число физических единиц вируса на одну клетку.
- Осуществлять установку связей между фенотипом опухолевой клетки и генотипом патологического агента.
- Выявлять различия в ультраструктуре клеток опухолей при наличии и отсутствии вирусной этиологии и различном наследственном мутационном статусе генов репарации ДНК.
- При терапии опухолей с применением продукции нанотехнологий осуществлять оценку эффективности лечения, локализации наночастиц в клетке, характера и успешности их действия.
- Одна из причин канцерогенеза – нарушение функционирования митохондрий; соответственно, эти органоиды являются и объектом терапии, а их изучение без применения электронной микроскопии невозможно [80–91].

Заключение

Таким образом, несмотря на развитие современных методов исследований, электронная микроскопия остается необходимым, а в ряде случаев и ведущим методом в практике как для онколога-клинициста, так и для онколога-исследователя, патолога. Следует подчеркнуть, что в настоящее время особенно важен междисциплинарный подход к диагностике, лечению и профилактике онкологических заболеваний органов и тканей, где особую ценность приобретают результаты комплекса различных методов, применяемых в исследовании, включая электронную микроскопию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Norman RA.* Dr Rudolph Virchow, the Father of Pathology. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing, 2022. 175 p.
2. *Duijster JW, Franz E, Neeffes J, Mughini-Gras L.* Bacterial and parasitic pathogens as risk factors for cancers in the gastrointestinal tract: a review of current epidemiological knowledge. *Front Microbiol.* 2021;12:790256. DOI: 10.3389/fmicb.2021.790256.
3. *Westermann D.* Carcinogenic effects of viral infections. *J Carcinog.* 2023;22(1):90–8. DOI: 10.4103/jcar.jcar_22_01_13.
4. *Bergonzini V, Salata C, Calistri A, Parolin C, Palù G.* View and review on viral oncology research. *Infect Agent Cancer.* 2010;5:11. DOI: 10.1186/1750-9378-5-11.
5. *Rous P.* A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 1911;13(4):397–411. DOI: 10.1084/jem.13.4.397.
6. *Rous P, Beard JW.* The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (shope). *J Exp Med.* 1935;62(4):523–48. DOI: 10.1084/jem.62.4.523.
7. *Gross L.* “Spontaneous” leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;76(1):27–32. PMID: 14816382.
8. *Friend C.* Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med.* 1957;105(4):307–18. DOI: 10.1084/jem.105.4.307.
9. *Graffi A.* Chloroleukemia of mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1957;68(2):540–58. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1957.tb56107.x.
10. *Moloney JB.* Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst.* 1960;24:933–51. PMID: 14423465.
11. *Gross L.* A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;83(2):414–21. DOI: 10.3181/00379727-83-20376.
12. *Eddy BE, Borman GS, Grubbs GE, Young RD.* Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology.* 1962;17:65–75. DOI: 10.1016/0042-6822(62)90082-x.
13. *Girardi AJ, Sweet BH, Slotnick VB, Hilleman MR.* Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vaccinating virus, SV-40. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;109:649–60. DOI: 10.3181/00379727-109-27298.
14. *Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G.* The quest for human cancer viruses. *Science.* 1962;137(3533):835–41. DOI: 10.1126/science.137.3533.835.
15. *de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health.* 2020;8(2):e180–e190. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
16. *Spurgeon ME.* Small DNA tumor viruses and human cancer: preclinical models of virus infection and disease. *Tumour Virus Res.* 2022;14:200239. DOI: 10.1016/j.tvr.2022.200239.
17. *Arga KY, Kori M.* Chapter 10 – Current status of viral biomarkers for oncogenic viruses. In: M.M. Ennaji (ed.). *Oncogenic Viruses. Vol. 2: Medical Applications of Viral Oncology Research.* Academic Press, 2023. P. 221–252. DOI: 10.1016/B978-0-12-824156-1.00009-1.
18. *Tiwari P, Yadav A, Kaushik M, Dada R.* Cancer risk and male infertility: unravelling predictive biomarkers and prognostic indicators. *Clin Chim Acta.* 2024;558:119670. DOI: 10.1016/j.cca.2024.119670.
19. *Tarin D.* Causes of cancer and mechanisms of carcinogenesis. In: D. Tarin. *Understanding cancer: the molecular mechanisms, biology, pathology and clinical implications of malignant neoplasia.* Cham: Springer International Publishing, 2023. P. 229–279. DOI: 10.1007/978-3-030-97393-3_9.
20. *Mikhaleva LM, Pechnikova VV, Pshikhachev AM, Rogov KA, Gusniev MA, Patsap OI et al.* Bladder cancer: update on risk factors, molecular and ultrastructural patterns. *Curr Med Chem.* 2021;28(41):8517–33. DOI: 10.2174/0929867328666210309111731.
21. *Заридзе Д.Г., Максимович Д.М.* Профилактика злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии. 2017;4(2):8–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-2-8-25.
22. *Zaridze DG, Maksimovich DM.* Prevention of malignant neoplasms. *Advances in Molecular Oncology.* 2017;4(2):8–25 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-2-8-25.
22. *Наумова Л.А., Стародумова В.А.* Современные представления о цервикальном канцерогенезе. Бюллетень сибирской медицины. 2023;22(2):145–155. DOI: 10.20538/1682-0363-2023-2-145-155.
22. *Naumova LA, Starodumova VA.* Modern concepts in cervical carcinogenesis. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2023;22(2):145–155 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2023-2-145-155.
23. *Münz C.* Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(11):691–700. DOI: 10.1038/s41579-019-0249-7.
24. *Gaglia MM, Munger K.* More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses. *Curr Opin Virol.* 2018;32:48–59. DOI: 10.1016/j.coviro.2018.09.003.
25. *Golais F, Mrázová V.* Human alpha and beta herpesviruses and cancer: passengers or foes? *Folia Microbiol (Praha).* 2020;65(3):439–49. DOI: 10.1007/s12223-020-00780-x.
26. *Chen CJ, You SL, Hsu WL, Yang HI, Lee MH, Chen HC et al.* Epidemiology of virus infection and human cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2021:13–45. DOI: 10.1007/978-3-030-57362-1_2.

27. Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Observational studies*. 2020;6(2):1–9. DOI: 10.1353/obs.2020.0000.
28. Koterov AN. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence, and radiation aspect. Report 4, part 3: breadth of the use of criteria in different disciplines and different organizations. *Biology Bulletin*. 2023;50(11):2935–55. DOI: 10.1134/S1062359023110109.
29. Chang Y, Moore PS, Weiss RA. Human oncogenic viruses: nature and discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1732):20160264. DOI: 10.1098/rstb.2016.0264.
30. Sarid R, Gao SJ. Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer Lett*. 2011;305(2):218–27. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.09.011.
31. Bizuayehu HM, Dadi AF, Hassen TA, Ketema DB, Ahmed KY, Kassa ZY et al. Global burden of 34 cancers among women in 2020 and projections to 2040: population-based data from 185 countries/territories. *Int J Cancer*. 2024;154(8):1377–93. DOI: 10.1002/ijc.34809.
32. Al-Sayegh H, Al-Zadjali S, Al-Moundhri M. Analyzing cancer incidence trends in Oman from 1996 to 2019: a comprehensive study of the National cancer annual reports. *JCO Glob Oncol*. 2024;10:e2300337. DOI: 10.1200/GO.23.00337.
33. Лагурева А.В., Плехова Н.Г., Апанасевич В.И. Оценка роли вирусов папилломы человека и Эпштейна–Барр в развитии эпителиальных опухолей молочной железы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(1):5–14. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.
Lagureva AV, Plekhova NG, Apanasevich VI. Role of HPV and Epstein–Barr virus in the development of epithelial breast tumors. *Clinical and experimental morphology*. 2023;12(1):5–14 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.
34. Мидибер К.Ю., Бирюков А.Е., Печникова В.В., Грачева Н.А., Шахпазян Н.К., Гюева З.В. и др. Клинико-морфологическая неоднородность рака желудка диффузного типа. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(S4):34–41. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41.
Midiber KY, Biryukov AE, Pechnikova VV, Gracheva NA, Shakhpazyan NK, Gyoeva ZV et al. Clinical and morphological heterogeneity of diffuse gastric cancer. *Clinical and experimental morphology*. 2021;10(S4):34–41 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41.
35. Saravanan C, Baskar M, Ahmed SSSJ, Veerabathiran R. Chapter 7 – Role of viral human oncogenesis: recent developments in molecular approaches. In: M.M. Ennaji (ed.). *Oncogenic Viruses. Volume 2: Medical Applications of Viral Oncology Research*. Academic Press, 2023. P. 147–72. DOI: 10.1016/B978-0-12-824156-1.00006-6.
36. Krewski D, Al-Zoughool M, Bird M, Birkett N, Billard M, Milton B et al. Analysis of key characteristics of human carcinogens. In: R.A. Baan, B.W. Stewart, K. Straif (eds.). *Tumour site concordance and mechanisms of carcinogenesis*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019. P. 257–82.
37. Epstein MA, Achong BG. Morphology of the virus and of virus-induced cytopathologic changes. In: M.A. Epstein, B.G. Achong (eds.). *The Epstein–Barr virus*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1979. P. 23–37. DOI: 10.1007/978-3-642-67236-1_2.
38. Gelardi M, Tomaiuolo M, Cassano M, Besozzi G, Fiorella ML, Calvario A et al. Epstein–Barr virus induced cellular changes in nasal mucosa. *Virology*. 2006;336:3–6. DOI: 10.1186/1743-422X-3-6.
39. Alberti A, Diana S, Scullard GH, Eddleston WF, Williams R. Full and empty Dane particles in chronic hepatitis B virus infection: relation to hepatitis B e antigen and presence of liver damage. *Gastroenterology*. 1978;75(5):869–74. PMID: 700329.
40. Howard CR, Sundquist B, Allan J, Brown SE, Chen SH, Morein B. Preparation and properties of immune-stimulating complexes containing hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol*. 1987;68(Pt 9):2281–9. DOI: 10.1099/0022-1317-68-9-2281.
41. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 7):1755–60. DOI: 10.1099/0022-1317-75-7-1755.
42. Falcón V, Acosta-Rivero N, González S, Dueñas-Carrera S, Martínez-Donato G et al. Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis. *Virus Genes*. 2017;53(2):151–64. DOI: 10.1007/s11262-017-1426-2.
43. Said JW, Chien K, Tasaka T, Koeffler HP. Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma lesions: electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV). *J Pathol*. 1997;182(3):273–81. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<273::AID-PATH835>3.0.CO;2-P
44. Schulz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *J Gen Virol*. 1998;79:1573–91. DOI: 10.1099/0022-1317-79-7-1573.
45. Cao S, Maldonado JO, Grigsby IF, Mansky LM, Zhang W. Analysis of human T-cell leukemia virus type 1 particles by using cryo-electron tomography. *J Virol*. 2015;89(4):2430–5. DOI: 10.1128/JVI.02358-14.
46. Maldonado JO, Cao S, Zhang W, Mansky LM. Distinct morphology of human T-cell leukemia virus type 1-like particles. *Viruses*. 2016;8(5):132. DOI: 10.3390/v8050132.
47. Oliveira LH, Frugulhetti IC, Passos MR, Cavalcanti SM, Fonseca ME. Human papillomavirus detection in genital lesions by in situ hybridization and ultrastructural observations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89(2):195–202. DOI: 10.1590/s0074-02761994000200013.
48. Broich G, Sasaki T. Electron microscopic detection of human papillomavirus particles in oral proliferative lesions. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1989;30(4):213–20. PMID: 2561816.
49. He M, Chi X, Zha Z, Li Y, Chen J, Huang Y et al. Structural basis for the shared neutralization mechanism of three classes of human papillomavirus type 58 antibodies with disparate modes of binding. *J Virol*. 2021;95(7):e01587-20. DOI: 10.1128/JVI.01587-20.
50. Juan HY, Khachemoune A. A review of Merkel cell carcinoma. *JAAPA*. 2023;36(11):11–6. DOI: 10.1097/01.JAAP.0000979460.69305.b7.
51. Becker M, Dominguez M, Greune L, Soria-Martinez L, Pfeiderer MM, Schowalter R et al. Infectious entry of Merkel cell polyomavirus. *J Virol*. 2019;93(6):e02004–18. DOI: 10.1128/JVI.02004-18.
52. Zhou X, Zhu C, Li H. BK polyomavirus: latency, reactivation, diseases and tumorigenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1263983. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1263983.

53. Venuti A, Romero-Medina MC, Melita G, Ceraolo MG, Brancaccio RN, Sirand C et al. Lyon IARC polyomavirus displays transforming activities in primary human cells. *J Virol*. 2022;96(14):e0206121. DOI: 10.1128/jvi.02061-21.
54. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(3):127–50. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.12.005.
55. Ko EJ, Song KS, Ock MS, Choi YH, Kim S, Kim HS et al. Expression profiles of human endogenous retrovirus (HERV)-K and HERV-R Env proteins in various cancers. *BMB Rep*. 2021;54(7):368–73. DOI: 10.5483/BMBRep.2021.54.7.246.
56. McGee-Avila JK, Suneja G, Engels EA, Rositch AF, Horner MJ, Luo Q et al. Cancer treatment disparities in people with HIV in the United States, 2001–2019. *J Clin Oncol*. 2024;42(15):1810–20. DOI: 10.1200/JCO.23.02366.
57. Chowdhary S, Deka R, Panda K, Kumar R, Solomon AD, Das J et al. Recent updates on viral oncogenesis: available preventive and therapeutic entities. *Mol Pharm*. 2023;20(8):3698–740. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c01080.
58. Isagulians M, Bayurova E, Avdoshina D, Kondrashova A, Chioldi F, Palefsky JM. Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):305. DOI: 10.3390/cancers13020305.
59. Galati L, Chiantore MV, Marinaro M, Di Bonito P. Human oncogenic viruses: characteristics and prevention strategies—lessons learned from human papillomaviruses. *Viruses*. 2024;16(3):416. DOI: 10.3390/v16030416.
60. Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1732):20160271. DOI: 10.1098/rstb.2016.0271.
61. Aye R, Ofori MEO, Wright E, Quaye O. Epstein–Barr virus associated lymphomas and epithelia cancers in humans. *J Cancer*. 2020;11(7):1737–50. DOI: 10.7150/jca.37282.
62. Wong Y, Meehan MT, Burrows SR, Doolan DL, Miles JJ. Estimating the global burden of Epstein–Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022;148(1):31–46. DOI: 10.1007/s00432-021-03824-y.
63. Schiller JT, Lowy DR. An introduction to virus infections and human cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2021;217:1–11. DOI: 10.1007/978-3-030-57362-1_1.
64. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(12):878–89. DOI: 10.1038/nrc2961.
65. Соловьев В.Д., Хесин Я.Е., Быковский А.Ф. Очерки по вирусной цитопатологии. Москва: Медицина, 1979. 320 с. Solovyov VD, Khesin YaE, Bykovsky AF. Essays on viral cytopathology. Moscow: Meditsina, 1979. 320 p. (In Russ.).
66. Erlandson RA. Application of transmission electron microscopy to human tumor diagnosis: an historical perspective. *Cancer Invest*. 1987;5(5):487–505. DOI: 10.3109/07357908709032906.
67. Erlandson RA. Role of electron microscopy in modern diagnostic surgical pathology. *Modern Surgical Pathology*. 2009:71–84. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3966-2.00005-9.
68. Xia F, Youcef-Toumi K. Review: advanced atomic force microscopy modes for biomedical research. *Biosensors (Basel)*. 2022;12(12):1116. DOI: 10.3390/bios12121116.
69. Riesterer JL, López CS, Stempinski ES, Williams M, Loftis K, Stoltz K et al. A workflow for visualizing human cancer biopsies using large-format electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2020;158:163–81. DOI: 10.1016/bs.mcb.2020.01.005.
70. Cohen Hyams T, Mam K, Killingsworth MC. Scanning electron microscopy as a new tool for diagnostic pathology and cell biology. *Micron*. 2020;130:102797. DOI: 10.1016/j.micron.2019.102797.
71. Jung MK, Mun JY. Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *J Vis Exp*. 2018;(131):56482. DOI: 10.3791/56482.
72. Malatesta M. Transmission electron microscopy as a powerful tool to investigate the interaction of nanoparticles with subcellular structures. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12789. DOI: 10.3390/ijms222312789.
73. Doane FW, Anderson N, Chao J, Noonan A. Two-hour embedding procedure for intracellular detection of viruses by electron microscopy. *Appl Microbiol*. 1974;27(2):407–10. DOI: 10.1128/am.27.2.407-410.1974.
74. Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron*. 2006;37(2):91–106. DOI: 10.1016/j.micron.2005.10.001.
75. Webster P. Microwave-assisted processing and embedding for transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 2007;369:47–65. DOI: 10.1007/978-1-59745-294-6_4.
76. Roingeard P, Raynal PI, Eymieux S, Blanchard E. Virus detection by transmission electron microscopy: still useful for diagnosis and a plus for biosafety. *Rev Med Virol*. 2019;29(1):e2019. DOI: 10.1002/rmv.2019.
77. Goldsmith CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):552–63. DOI: 10.1128/CMR.00027-09.
78. Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Тимофеева Т.А., Федякина И.Т. Криоэлектронная микроскопия оболочечных вирусов на базе усовершенствованного просвечивающего электронного микроскопа: вирусы гриппа типа А, В и коронавирус SARS-CoV-2. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2023;78(3S):21–26. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-4.
79. Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Тимофеева Т.А., Федякина И.Т. Cryo-electron microscopy of enveloped viruses using upgraded transmission electron microscope: influenza type A, B viruses and SARS-CoV-2. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2023;78(3S):21–26 (In Russ.). DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-4.
79. Chu CH, Tseng WW, Hsu CM, Wei AC. Image analysis of the mitochondrial network morphology with applications in cancer research. *Front Phys*. 2022;10:855775. DOI: 10.3389/fphy.2022.855775.
80. Kawano I, Bazila B, Ježek P, Dlasková A. Mitochondrial dynamics and cristae shape changes during metabolic reprogramming. *Antioxid Redox Signal*. 2023;39(10-12):684–707. DOI: 10.1089/ars.2023.0268.
81. Gomathi AC, Rajarathinam SX, Sadiq AM, Rajeshkumar S. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of *Tamarindus indica* on MCF-7

- human breast cancer cell line. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;55:101376. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101376.
82. *Miri A, Darroudi M, Sarani M.* Biosynthesis of cerium oxide nanoparticles and its cytotoxicity survey against colon cancer cell line. *Appl Organometal Chem.* 2020;34(1):e5308. DOI: 10.1002/aoc.5308.
83. *Zadeh FA, Bokov DO, Salahdin OD, Abdelbasset WK, Jawad MA, Kadhim MM et al.* Cytotoxicity evaluation of environmentally friendly synthesis Copper/Zinc bimetallic nanoparticles on MCF-7 cancer cells. *Rend Lincei Sci Fis Nat.* 2022;33(2):441–7. DOI: 10.1007/s12210-022-01064-x.
84. *Gheyntanchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M et al.* Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):204. DOI: 10.1186/s12935-021-01898-9.
85. *Петрова И.Д., Зайцев Б.Н., Таранов О.С.* Концентрирование вирусов и электронная микроскопия. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):276–283. DOI: 10.18699/VJ20.620.
Petrova ID, Zaitsev BN, Taranov OS. Concentration of viruses and electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020;24(3):276–283 (In Russ.). DOI: 10.18699/VJ20.620.
86. *Kloker LD, Berchtold S, Smirnow I, Schaller M, Fehrenbacher B, Krieg A et al.* The oncolytic herpes simplex virus Talimogene laherparepvec shows promising efficacy in neuroendocrine cancer cell lines. *Neuroendocrinology.* 2019;109(4):346–61. DOI: 10.1159/000500159.
87. *He K, Shokuhfar T, Shahbazian-Yassar R.* Imaging of soft materials using in situ liquid-cell transmission electron microscopy. *J Phys Condens Matter.* 2019;31(10):103001. DOI: 10.1088/1361-648X/aaf616.
88. *Grasso D, Zampieri LX, Capelôa T, Van de Velde JA, Sonveaux P.* Mitochondria in cancer. *Cell Stress.* 2020;4(6):114–46. DOI: 10.15698/cst2020.06.221.
89. *Saha T, Dash C, Jayabalan R, Khiste S, Kulkarni A, Kurmi K et al.* Intercellular nanotubes mediate mitochondrial trafficking between cancer and immune cells. *Nat Nanotechnol.* 2022;17(1):98–106. DOI: 10.1038/s41565-021-01000-4.
90. *Atasheva S, Emerson CC, Yao J, Young C, Stewart PL, Shayakhmetov DM.* Systemic cancer therapy with engineered adenovirus that evades innate immunity. *Sci Transl Med.* 2020;12(571):eabc6659. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc6659.
91. *Adhikari P, Hasan M, Sridhar V, Roy D, Pradhan P.* Studying nanoscale structural alterations in cancer cells to evaluate ovarian cancer drug treatment, using transmission electron microscopy imaging. *Phys Biol.* 2020;17(3):036005. DOI: 10.1088/1478-3975/ab6abb.

Информация об авторах

Мария Александровна Козлова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии клетки, заведующая группой электронной микроскопии референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Давид Александрович Арешидзе – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией патологии клетки 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

Maria A. Kozlova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Cell Pathology, Head of the Electron Microscopy Group, Reference Center for Infectious and Viral Oncopathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-6251-2560>

David A. Areshidze – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

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>

Сравнительный анализ изменений морфологии стенки восходящей аорты у пациентов с двустворчатым и трехстворчатым аортальным клапаном при ее аневризме

Т.В. Сухачева^{1,2}, Е.В. Пеняева¹, М.А. Соборов^{1,3}, С.В. Гарманов¹,
М.Б. Кокоев¹, В.А. Мироненко¹, Р.А. Серов¹

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева Минздрава России, 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

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Аневризма аорты характеризуется расширением диаметра аорты в 1,5 раза и более и может приводить к расслоению и разрыву стенки аорты с фатальными последствиями. Цель исследования – сравнительный анализ изменений морфологии стенки восходящей аорты у пациентов с двустворчатым и трехстворчатым аортальным клапаном при ее аневризме.

Материалы и методы. В работе проведено исследование биоптатов восходящего отдела аорты с аневризмой у 49 пациентов с двустворчатым и 99 пациентов с трехстворчатым аортальным клапаном.

Результаты. У пациентов с двустворчатым и трехстворчатым аортальным клапаном диаметр восходящей аорты составил, соответственно, $51,0 \pm 9,1$ мм и $54,6 \pm 11,5$ мм. Морфометрическое исследование толщины слоев стенки аорты продемонстрировало у пациентов с трехстворчатым аортальным клапаном по сравнению с пациентами с двустворчатым аортальным клапаном достоверное утолщение интимы ($71,7 \pm 52,3$ и $143,5 \pm 148,1$ мкм) и адвентиции аорты ($595,9 \pm 253,9$ и $801,3 \pm 388,6$ мкм) ($p < 0,05$), в то время как толщина меди (1127,0 ± 246,9 и 1177,9 ± 268,32 мкм) у этих пациентов практически не отличалась. Изменения в меди аорты (фрагментация эластических мембран, нарушение параллельного расположения гладкомышечных клеток, плотность распределения *vasa vasorum*) наблюдались достоверно реже у пациентов с двустворчатым аортальным клапаном по сравнению с пациентами, имеющими трехстворчатый аортальный клапан. У пациентов с двустворчатым аортальным клапаном необходимость в оперативном вмешательстве возникала в более молодом возрасте, чем у пациентов с трехстворчатым аортальным клапаном, в то время как признаки ремоделирования интимы и меди аорты были выражены в меньшей степени, чем у пациентов с трехстворчатым аортальным клапаном.

Заключение. У пациентов с двустворчатым аортальным клапаном показания к оперативному вмешательству возникают при менее выраженных изменениях морфологии стенки восходящей аорты. Построение стереометрической модели гистологических изменений стенки аорты при ее аневризме позволит количественно представить роль ключевых морфологических характеристик, упростить патологоанатомическую диагностику и оптимизировать хирургическую тактику лечения пациентов с этой патологией.

Ключевые слова: двустворчатый аортальный клапан, трехстворчатый аортальный клапан, аневризма аорты, интима аорты, медиа аорты

Для корреспонденции: Татьяна Владимировна Сухачева. E-mail: sukhachevat@gmail.com

Для цитирования: Сухачева Т.В., Пеняева Е.В., Соборов М.А., Гарманов С.В., Кокоев М.Б., Мироненко В.А., Серов Р.А. Сравнительный анализ изменений морфологии стенки восходящей аорты у пациентов с двустворчатым и трехстворчатым аортальным клапаном при ее аневризме. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):18–28. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.18-28.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева (№ DVNB-2023-0011).

Статья поступила 30.07.2024. Получена после рецензирования 16.08.2024. Принята в печать 26.09.2024.

Comparative analysis of morphological changes in the wall of the ascending aorta in patients with bicuspid and tricuspid aortic valves in aortic aneurysm

T.V. Sukhacheva^{1,2}, E.V. Penyaeva¹, M.A. Soborov^{1,3}, S.V. Garmanov¹,
M.B. Kokoev¹, V.A. Mironenko¹, R.A. Serov¹

¹ A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia

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

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Aortic aneurysm is characterized by aortic diameter expansion by 1.5 or more times and can lead to dissection and rupture of the aortic wall with fatal consequences. The aim of the study was to compare changes in the morphology of the ascending aorta wall in patients with bicuspid and tricuspid aortic valves (BAV and TAV, respectively) having an aortic aneurysm.

Materials and methods. We examined biopsies of the ascending aorta with an aneurysm in 49 patients with BAV and 99 patients with TAV.

Results. The diameter of the ascending aorta was 51.0±9.1 mm in patients with BAV and that in individuals with TAV was 54.6±11.5 mm. Morphometric study of aortic wall layers demonstrated a significant thickening of the intima (71.7±52.3 and 143.5±148.1 μm, respectively) and adventitia of the aorta (595.9±253.9 and 801.3±388.6 μm, respectively) [$p < 0.05$], while the thickness of the media was almost the same (1127.0±246.9 and 1177.9±268.32 μm, respectively). Changes in the aortic media (fragmentation of elastic membranes, disruption of the parallel arrangement of smooth muscle cells, and density of vasa vasorum) were significantly less frequent in patients with BAV. Patients with BAV required surgery at a younger age than those with TAV, although they showed less pronounced signs of remodeling of aortic intima and media.

Conclusion. Patients with BAV necessitate surgery when having less pronounced changes in the morphology of the ascending aortic wall. Construction of a stereometric model of histological changes in the aortic wall in an aortic aneurysm will allow us to quantitatively represent the role of key morphological characteristics, simplify pathological diagnosis, and optimize surgical management for patients with BAV.

Keywords: bicuspid aortic valve, tricuspid aortic valve, aortic aneurysm, aortic intima, aortic media

Corresponding author: Tatiana V. Sukhacheva. E-mail: sukhachevat@gmail.com

For citation: Sukhacheva T.V., Penyaeva E.V., Soborov M.A., Garmanov S.V., Kokoev M.B., Mironenko V.A., Serov R.A. Comparative analysis of morphological changes in the wall of the ascending aorta in patients with bicuspid and tricuspid aortic valves in aortic aneurysm. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):18–28 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.18-28.

Funding. The study was carried out within the framework of the State Assignment to A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery (No. DVNB-2023-0011).

Received 30.07.2024. **Received in revised form** 16.08.2024. **Accepted** 26.09.2024.

Введение

Двустворчатый аортальный клапан (ДАК) является наиболее частым врожденным пороком сердца, встречающимся у 1–2% населения. Люди с ДАК подвержены значительно более высокому риску развития серьезных аортальных осложнений, чем имеющие трехстворчатый аортальный клапан (ТАК), в связи с повышенной гемодинамической нагрузкой, вызванной самой морфологией ДАК. Пациентам с ДАК при выполнении операции протезирования аортального клапана (АК) по поводу его порока рекомендуется протезирование восходящей аорты, если ее дилатация превышает 50 мм и имеются факторы риска, в то время как пациентам с ТАК подобное хирургическое вмешательство рекомендовано при дилатации аорты свыше 55 мм [1]. Тенденция к более агрессивному хирургическому подходу у пациентов с расширенной аортой при ДАК обусловлена тем, что

ДАК является фактором риска возникновения дилатации, аневризмы и расслоения корня аорты, причем даже в тех случаях, когда гемодинамические нарушения функции самого клапана минимальны [2].

На формирование дилатации аорты существенное влияние оказывают свойства сосудистой стенки, геометрия аортального русла и композиция потоков крови внутри аорты. В норме при ТАК поток крови в аорте закручен с максимальной скоростью в центре и замедлением в области контакта с сосудистой стенкой на периферии [3]. ДАК формируется внутриутробно, при сращении створок центр потока смещается в зависимости от того, какие створки соединены между собой. Смещение центра потока нарушает работу механизма Виндкесселя и определяет повышение нагрузки на стенку аорты. В этих условиях формируется фиброз створок АК, который приводит в последующем

к аортальному пороку, чаще к пятой декаде жизни [4]. По-видимому, один из главных факторов в процессе формирования дилатации аорты при ДАК – повышение механического воздействия на аортальную стенку. В случае дилатации аорты при ТАК ведущим является фактор нарушения структуры аортальной стенки. В связи с этим вначале из-за изменений сосудистой стенки происходит расширение восходящего отдела аорты, а затем уже формируется аортальный порок.

Кроме того, известно, что аневризма восходящего отдела аорты у пациентов с ДАК клинически и морфологически отличается от таковой у пациентов с ТАК. Важный фактор, провоцирующий развитие аортопатии у пациентов с ДАК, помимо наличия асимметричной гемодинамической нагрузки – особый эмбриональный фенотип гладкомышечных клеток (ГМК), которые обладают свойствами, отличающимися от ГМК пациентов с ТАК [5–10]. Более того, механические свойства стенки восходящей аорты у пациентов с ДАК отличаются от таковых у пациентов с ТАК, например, биомеханический тест выявил более высокие значения пикового напряжения перед разрывом стенки аорты у пациентов с ДАК, чем у пациентов с ТАК. У пациентов с ДАК разрыв стенки аорты равномерно охватывает все слои стенки, тогда как у пациентов с ТАК разрыв стенки по-

степенный и прогрессирующий [11]. Предполагается, что исследование топографии нарушений гистологического строения стенки аорты у пациентов с ДАК и ТАК и аневризмой аорты будет иметь прогностическое значение, позволит выделить пациентов, предрасположенных к аортопатии, и оптимизировать хирургическую тактику.

Цели исследования – проведение сравнительного анализа изменений морфологии стенки восходящей аорты у пациентов с ДАК и ТАК при ее аневризме и разработка подходов к созданию стереометрической модели гистологических изменений аорты при этой патологии, которая позволит унифицировать и упростить морфологическую диагностику и оптимизировать хирургическую тактику лечения.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале интраоперационных биопсий восходящей аорты у 49 пациентов с ДАК в возрасте 18–74 лет (73% мужчин / 27% женщин) и 99 пациентов с ТАК в возрасте 22–84 лет (64% мужчин / 36% женщин) (табл. 1). По поводу расширения восходящего отдела аорты пациентам выполнены следующие виды вмешательств: пластическое вмешательство на восходящей аорте, супракоронарное

Таблица 1 | Table 1

Клиническая характеристика пациентов (M±m (min-max)) | Clinical characteristics of patients [M±m (min-max)]

| Клинические параметры Clinical parameters | ДАК (n=49) BAV (n=49) | ТАК (n=99) TAV (n=99) |
|--|---------------------------|----------------------------|
| Возраст, лет Age, years | 49,7±13,9 (18–74) | 58,7±10,7 (22–84)* |
| Пол Gender: | | |
| мужчины, % male, % | 73 | 64 |
| женщины, % female, % | 27 | 36 |
| Диаметр восходящей аорты, мм Diameter of the ascending aorta, mm | 49,3±9,9 (34–74) | 53,3±11,6 (30–100) |
| Диаметр корня аорты, мм Aortic root diameter, mm | 41,9±9,0 (28–85) | 46,5±12,4 (27–96)* |
| Ударный объем левого желудочка, мл Stroke volume of the left ventricle, ml | 98,1±40,6 (37,0–174,8) | 108,5±34,4 (36,4–206,4) |
| Фракция выброса левого желудочка, % Left ventricle ejection fraction, % | 71,9±14,9 (56–115) | 71,7±21,1 (36,5–114) |
| Фиброзное кольцо аортального клапана, мм Fibrous ring of the aortic valve, mm | 25,8±4,1 (18–38) | 25,1±3,3 (20–36) |
| Стеноз аортального клапана, % Aortic valve stenosis, % | 42,4 | 19,1 |
| Недостаточность аортального клапана II–IV степени, % Aortic valve insufficiency, grades II–IV, % | 51,5 | 71,4 |
| Артериальная гипертензия, % Arterial hypertension, % | 63,6 | 90,4* |
| Ишемическая болезнь сердца, % Coronary artery disease, % | 14,3 | 17,5 |

* p<0,05 (критерий Манна–Уитни) | *p<0.05 (Mann–Whitney test)

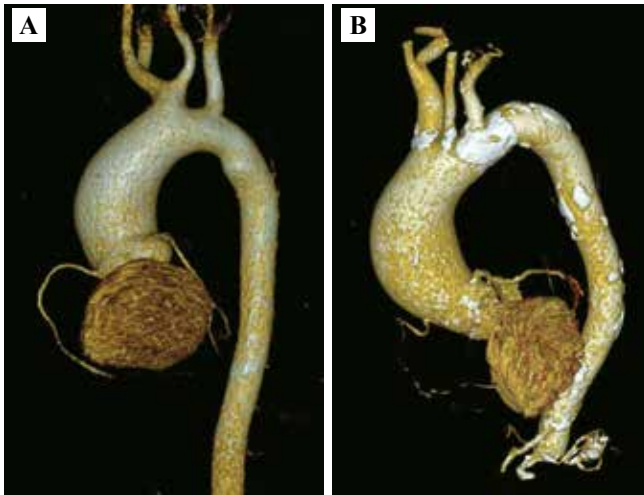


Рис. 1. МСКТ с контрастным усилением. Трехмерная реконструкция. Восходящий отдел аорты расширен у пациентов с ДАК (А) и ТАК (В).
А – пациент 43 лет с ДАК. В – пациентка 74 лет с ТАК
Fig. 1. Contrast-enhanced MSCT. 3D reconstruction. The ascending aorta is dilated in patients with BAV (A) and TAV (B).
A – a 43-year-old patient with BAV. B – a 74-year-old patient with TAV

протезирование восходящей аорты или радикальное вмешательство на корне аорты, операция Бенталла-Де Боно.

Перед операцией пациентам проводили стандартное обследование, включая трансторакальную ЭхоКГ и мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) (рис. 1), для определения диаметра восходящей аорты и воспроизведения посредством 3D-моделирования формы сосуда. В подавляющем большинстве случаев имели место диффузное расширение восходящего отдела аорты и истончение ее стенки.

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено этическим комитетом НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева (протокол № 2 от 07.10.2021). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на исследование биологического материала.

Забор биоптата проводили интраоперационно из передней части стенки восходящей аорты на 0,5–1,0 см выше уровня синотубулярного сочленения.

У пациентов с ДАК диаметр восходящей аорты составил $49,3 \pm 9,9$ мм, фракция выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) – $71,9 \pm 14,9\%$, ударный объем (УО) ЛЖ – $98,1 \pm 40,6$ мл. У пациентов с ТАК диаметр восходящей аорты составил $53,3 \pm 11,6$ мм, ФВ ЛЖ – $71,7 \pm 21,1\%$, УО ЛЖ – $108,5 \pm 34,4$ мл (табл. 1). Внешние признаки соединительнотканной дисплазии генетической природы у пациентов обеих групп не выявлены.

На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином ($\times 100$), выполнено морфометрическое исследование толщины слоев стенки аорты.

Проведена полуколичественная (4-балльная) оценка изменений морфологии интимы (миксоидные и атеросклеротические изменения) ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – очаговые изменения в единичных полях зрения; 2 – изменения в менее чем половине площади полей зрения; 3 – изменения в более чем половине площади полей зрения.

На этих же препаратах оценивали содержание ГМК в меди аорты в нескольких полях зрения ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – отсутствие ГМК на площади менее одной трети толщины меди; 2 – наличие ГМК на площади от одной трети до двух третей толщины меди; 3 – наличие ГМК на площади более двух третей толщины меди. Кроме того, по 4-балльной шкале определяли выраженность кистовидной дегенерации меди аорты и диффузной базофилии ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – базофилия в меди аорты или единичные кистовидные изменения; 2 – множественные очаги базофилии или несколько кистовидных образований; 3 – множественные кистовидные образования. Для определения глюкозаминогликанов в стенке аорты гистологические препараты окрашивали альциановым синим (рН 2,5). Далее на этих же препаратах оценивали выраженность хаотичного расположения ГМК по 4-балльной шкале ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – наличие очагов хаотично расположенных ГМК в единичных полях зрения; 2 – распространение очагов хаотично расположенных ГМК в менее чем половине площади полей зрения; 3 – хаотично расположенные ГМК присутствуют в более чем половине площади полей зрения. В препаратах также определяли наличие *vasa vasorum* во внутренних 2/3 меди аорты по 4-балльной шкале ($\times 100$): 0 – нет сосудов; 1 – многочисленные сосуды присутствуют в единичных полях зрения; 2 – наличие сосудов менее чем в половине полей зрения; 3 – наличие сосудов более чем в половине полей зрения.

Кроме того, для выявления эластики препараты окрашивали по Вейгерту и по 4-балльной шкале определяли характер расположения и степень фрагментации эластических мембран в меди аорты ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – очаговые изменения в единичных эластических мембранах в поле зрения; 2 – изменения и фрагментация эластических мембран в менее чем половине площади полей зрения; 3 – изменения наблюдаются в более чем половине площади полей зрения. На препаратах, окрашенных трихромом по Массону, определяли степень фиброза стенки аорты полуколичественно по 4-балльной шкале ($\times 100$): 0 – нет изменений; 1 – увеличение содержания коллагена на площади менее одной трети толщины меди; 2 – фиброз занимает от одной трети до двух третей толщины меди; 3 – фиброз занимает более двух третей толщины меди.

Полученные результаты были обработаны с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмена) при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Сравнительный анализ данных клинического обследования выявил у пациентов с ДАК и ТАК достоверные отличия по возрасту (среднее значение 49,7±13,9 года против 58,7±10,7 года), диаметру корня аорты (41,9±9,0 мм против 46,5±12,4 мм) и наличию артериальной гипертензии (63,6% против 90,4%) ($p<0,05$) (табл. 1). Показатели, характеризующие сократительную активность миокарда ЛЖ (ФВ ЛЖ, УО ЛЖ) и выраженность стеноза и недостаточности АК, не различались у пациентов этих групп. У пациентов с ДАК необходимость в хирургическом вмешательстве возникала раньше и при меньших показателях дилатации корня аорты, чем у пациентов с ТАК (рис. 2).

Морфометрическое исследование гистологических препаратов стенки аорты пациентов с ДАК и ТАК выявило достоверные различия толщины интимы (71,7±52,3 (16,0–240,8) мкм и 143,5±148,1 (14,0–848,0) мкм) и адвентиции (595,9±253,9 (197,1–1272,7) мкм и 801,3±388,6 (185,7–2156,9) мкм), соответственно ($p<0,05$), в то время как толщина меди и у пациентов двух групп достоверно не отличалась (1127,0±246,9 (503,3–1693,2) мкм и 1177,9±268,32 (255,6–1798,4) мкм) (рис. 2 А–С).

У пациентов с ДАК утолщение интимы, как правило, было связано с миксоидными изменениями в этом слое с накоплением кислых глюкозаминогликанов ($r=0,43$; $p=0,003$) и не коррелировало с дилатацией восходящей

аорты. У 22,9% пациентов с ДАК в интима зарегистрированы атеросклеротические изменения. Увеличение толщины интимы сочеталось с увеличением толщины меди ($r=0,43$; $p=0,003$) и изменением ее морфологии – фрагментацией эластических мембран ($r=0,46$; $p=0,002$), хаотичным расположением ГМК ($r=0,46$; $p=0,007$), увеличением числа *vasa vasorum* ($r=0,39$; $p=0,008$). В меди пациентов с ДАК реже, чем пациентов с ТАК, встречались очаги нарушения структуры стенки аорты и упорядоченного расположения ГМК (фрагментация эластических волокон, хаотичное расположение ГМК), а также *vasa vasorum* во внутренних отделах меди и участки, лишенные ГМК (критерий Манна–Уитни, $p<0,05$) (табл. 2).

У пациентов с ТАК утолщение интимы коррелировало с дилатацией восходящей аорты ($r=0,26$; $p=0,01$), недостаточностью АК ($r=0,45$; $p=0,0006$) в отличие от других слоев стенки аорты (рис. 3). Увеличение толщины интимы было связано с ее миксоидными ($r=0,31$; $p=0,002$) изменениями, иногда сопровождалось ее фиброзированием и атеросклеротическими изменениями ($r=0,39$; $p=0,008$) (рис. 4 А–С), последние были зарегистрированы у 40,7% пациентов с ТАК. Подобно тому, как это наблюдалось у пациентов с ДАК, у пациентов с ТАК утолщение интимы было связано с ремоделированием меди – фрагментацией эластических волокон ($r=0,32$; $p=0,002$), хаотичным расположением ГМК ($r=0,26$; $p=0,001$) и очаговым фиброзом меди ($r=0,35$;

Таблица 2 | Table 2

Результаты оценки морфологических изменений в интима и меди аорты пациентов с ДАК и ТАК и аневризмой аорты (медиана) | Results of the assessment of morphological changes in aortic intima and media of patients with BAV and TAV and an aortic aneurysm (median)

| | Морфологические признаки Morphological features | ДАК BAV | ТАК TAV |
|------------------------------|---|-----------|-----------|
| Интима аорты Aortic intima | Миксоидные изменения Muxoid changes | ++ | ++ |
| | Атеросклеротические изменения Atherosclerotic changes | + | + |
| Медия аорты Aortic media | Низкое содержание ГМК* Low count of smooth muscle cells* | ++ | +++ |
| | Кистовидная дегенерация Cystic degeneration | ++ | +++ |
| | Хаотичное расположение ГМК* Chaotic arrangement of smooth muscle cells* | + | ++ |
| | Наличие <i>vasa vasorum</i> во внутренних отделах меди* <i>Vasa vasorum</i> in the internal parts of the media* | ++ | +++ |
| | Фрагментация эластических волокон* Fragmentation of elastic fibers* | ++ | ++++ |
| | Фиброз Fibrosis | ++ | ++ |

* $p<0,05$ (критерий Манна–Уитни). +, ++, ++, +++ – выраженность изменений в соответствии с 4-балльной шкалой оценки |

* $p<0,05$ (Mann–Whitney test). +, ++, ++, +++ – severity of changes according to a 4-point assessment scale

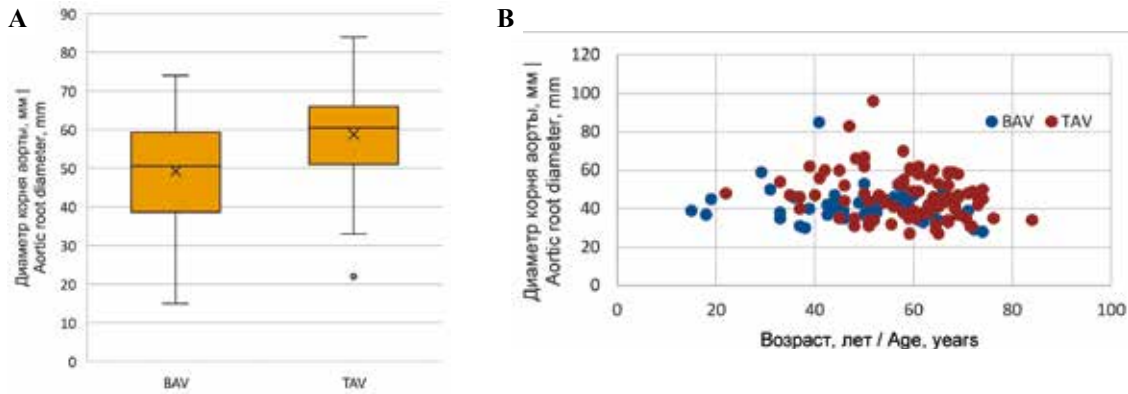


Рис. 2. Диаметр корня аорты у пациентов с ДАК и ТАК (А, $p < 0,05$) и его изменение с возрастом пациентов (В)
 Fig. 2. Aortic root diameter in patients with BAV and TAV (A, $p < 0,05$) and its change with patients' age (B)

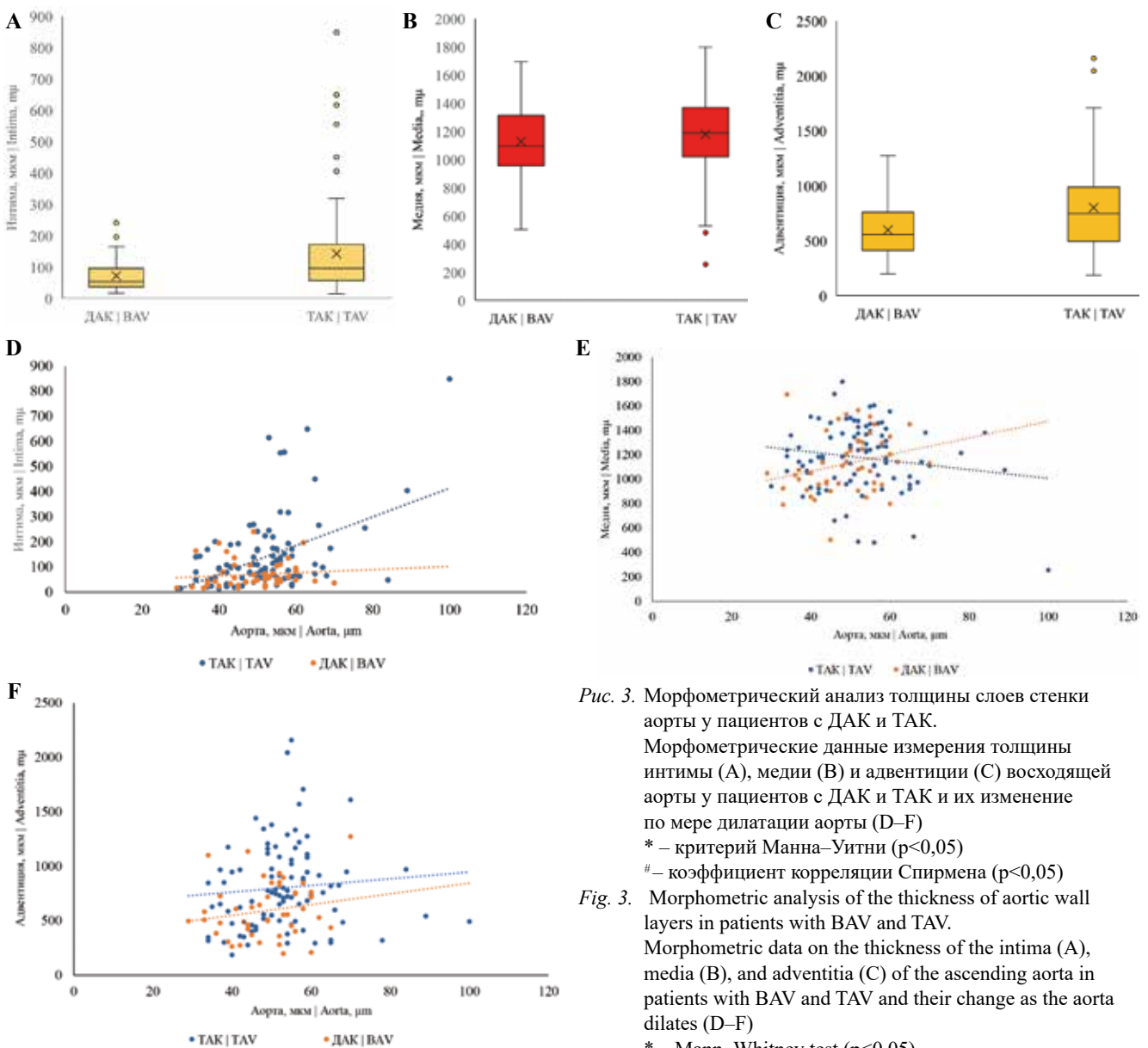


Рис. 3. Морфометрический анализ толщины слоев стенки аорты у пациентов с ДАК и ТАК.
 Морфометрические данные измерения толщины интимы (А), меди (В) и адвентиции (С) восходящей аорты у пациентов с ДАК и ТАК и их изменение по мере дилатации аорты (D–F)
 * – критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$)
 # – коэффициент корреляции Спирмена ($p < 0,05$)
 Fig. 3. Morphometric analysis of the thickness of aortic wall layers in patients with BAV and TAV.
 Morphometric data on the thickness of the intima (A), media (B), and adventitia (C) of the ascending aorta in patients with BAV and TAV and their change as the aorta dilates (D–F)
 * – Mann–Whitney test ($p < 0,05$)
 # – Spearman correlation coefficient ($p < 0,05$)

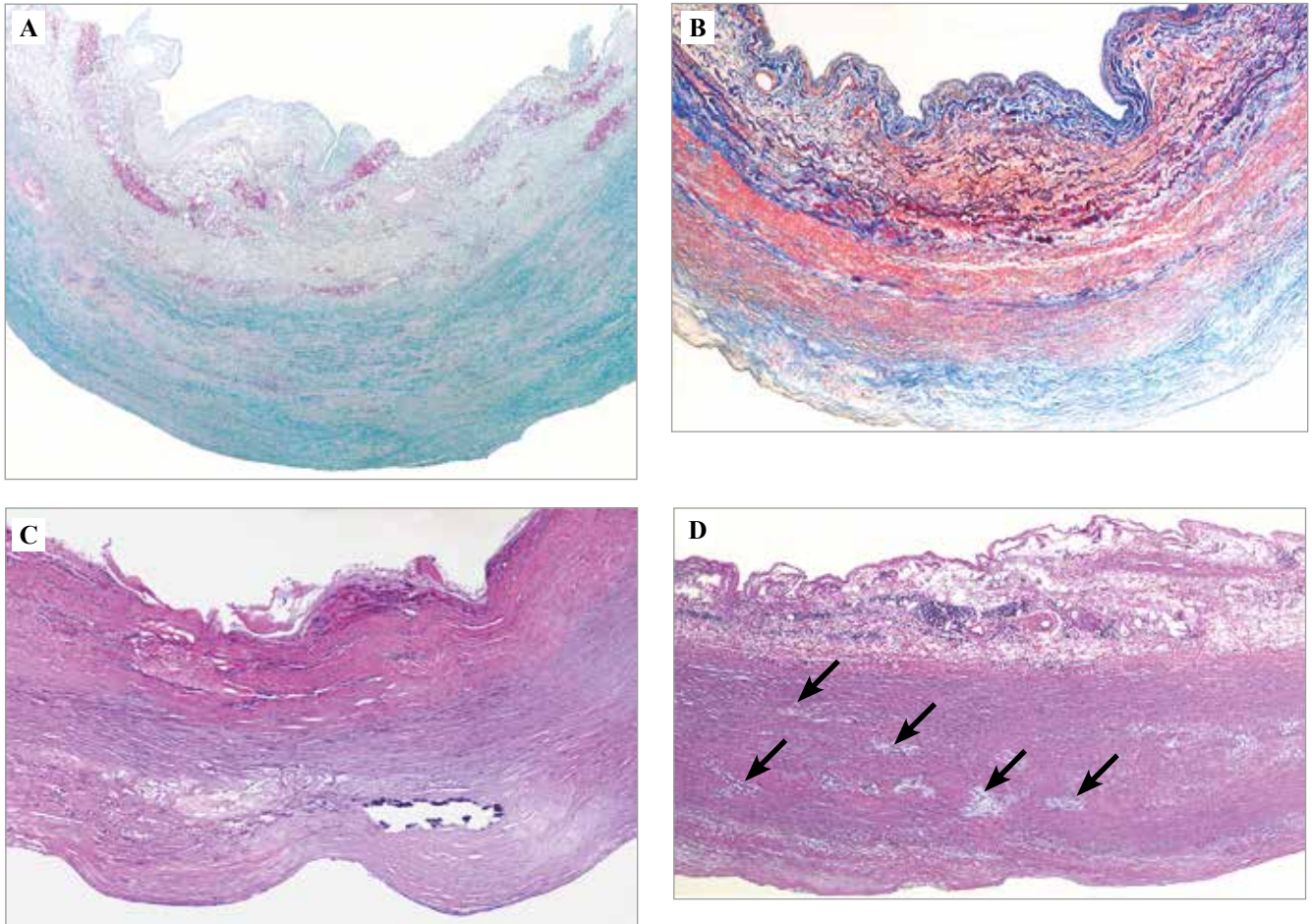


Рис. 4. Морфологические изменения интимы (А–С) и медиа (D–G) аорты пациентов с ТАК.

А – муксидные изменения интимы с накоплением кислых гликозаминогликанов. Окраска альциановым синим (рН 2,5), $\times 100$. Пациент 84 лет с ТАК. В – фибрирование интимы и медиа аорты. Окраска трихромом по Массону, $\times 100$. Пациент 50 лет с ТАК. С – атеросклеротические изменения интимы аорты с петрификацией. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. Пациент 52 лет с ТАК. D – кистовидная дегенерация медиа. Зоны, не содержащие ГМК (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. Пациент 64 лет с ТАК

Fig. 4. Morphological changes in aortic intima (A–C) and media (D–G) in patients with TAV.

A – mucoid changes in the aortic intima with accumulated acidic glycosaminoglycans. Alcian blue staining (pH 2.5), $\times 100$. A 84-year-old patient with TAV. B – fibrosis of aortic intima and media. Masson's trichrome staining, $\times 100$. A 50-year-old patient with TAV. C – atherosclerotic changes in the aortic intima with petrification. H&E, $\times 100$. A 52-year-old patient with TAV. D – cystic degeneration of the media. Zones without SMCs (arrows). H&E, $\times 100$. A 64-year-old patient with TAV

$p=0,0007$) (рис. 4 D–F). У некоторых пациентов во внутренних 2/3 толщины медиа аорты встречались *vasa vasorum* (рис. 4 G).

Обсуждение

В работе проведено исследование морфологических изменений стенки аорты у пациентов с ДАК и ТАК и дилатацией аорты. Сопоставление клинических данных пациентов с ДАК и ТАК показало, что необходимость коррекции АК и аневризмы аорты у пациентов с ДАК возникает в среднем на 10 лет раньше, чем у пациентов с ТАК, подобно описанному другими авторами [11, 12]. Кроме того, известно, что у пациентов с ДАК ремоделирование медиа аорты, в том числе апоптоз ГМК, обнаруживается раньше, чем у пациентов с ТАК, и наступает до выраженной

дилатации аорты, в основном в области повышенной нагрузки [13].

Морфометрическое исследование стенки восходящей аорты показало, что одним из характерных признаков ремоделирования интимы аорты при ее дилатации является увеличение толщины интимы, которое в большей степени характерно для пациентов с ТАК и реже наблюдается у пациентов с ДАК. Согласно данным литературы, утолщение интимы происходит за счет миграции фенотипически измененных ГМК из ее средней оболочки. Кроме того, в утолщенной интиме наблюдается значительное увеличение компонентов внеклеточного матрикса, преимущественно кислых гликозаминогликанов [8, 14, 15]. Необходимо отметить, что в нашем исследовании у пациентов с ДАК абсолютная толщина интимы аорты была значительно

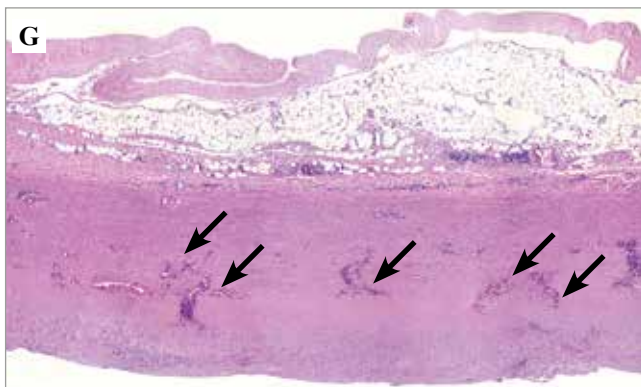
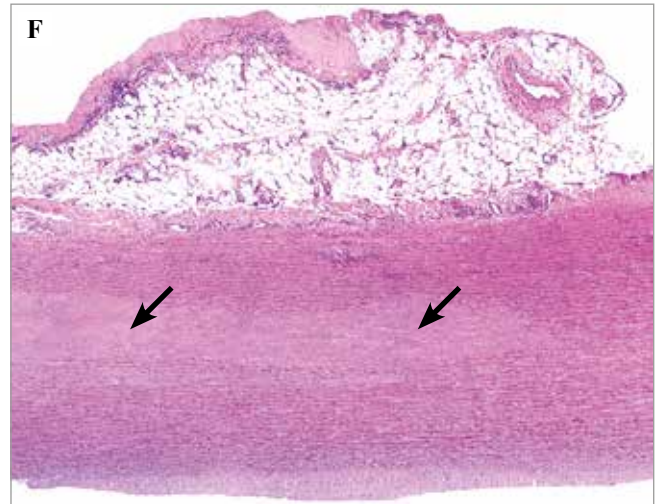
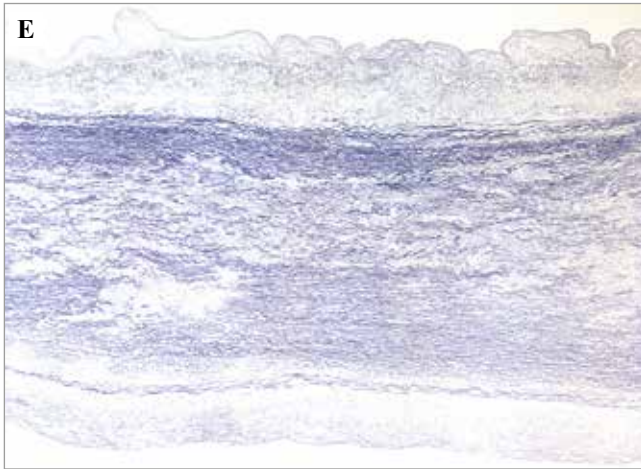


Рис. 4. Окончание. Е – фрагментация эластических волокон меди аорты. Окраска по Вейгерту, $\times 100$. Пациент 84 лет с ТАК. F – фиброз меди аорты (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. Пациент 40 лет с острым расслоением аорты и ТАК. G – множество *vasa vasorum* во внутренних 2/3 меди аорты (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. Пациент 61 года с ТАК

Fig. 4. End. E – fragmentation of elastic fibers of the aortic media. Weigert's stain, $\times 100$. An 84-year-old patient with TAV. F – fibrosis of aortic media (arrows). H&E stain, $\times 100$. A 40-year-old patient with acute aortic dissection and TAV. G – numerous *vasa vasorum* in the inner two-thirds of aortic media (arrows). H&E, $\times 100$. A 61-year-old patient with TAV

меньше и ее атеросклеротические изменения встречались реже, чем у пациентов с ТАК, как и в работах других авторов [9, 16]. Одним из возможных объяснений такой слабо выраженной адаптивной реакции интимы на дилатацию аорты у пациентов с ДАК можно считать сниженную способность ГМК к миграции и пролиферации (в условиях *in vitro*) по сравнению с ГМК пациентов с ТАК [5, 10].

В настоящей работе исследование морфологических изменений меди при аневризме аорты выявило у пациентов с ДАК хорошо организованную ламеллярную структуру средней оболочки аорты по сравнению с более хаотичной их организацией у пациентов с ТАК. Аналогичная закономерность, не связанная с дилатацией аорты, описана ранее [6, 9, 10]. Кроме того, у пациентов с ДАК реже наблюдаются ламинарный некроз, фиброз, кистовидная дегенерация меди аорты [7–9]. Описанные изменения меди чаще встречались и были выражены в большей степени у пациентов с ТАК, чем у имеющих ДАК, подобная перестройка морфологии среднего слоя аорты описана у пациентов с синдромом Марфана [17]. Более того, с возрастом также увеличивается частота таких неспецифических изменений среднего слоя аорты [18].

Очевидно, что у пациентов с ДАК и ТАК механизмы ремоделирования внеклеточного матрикса стенки аор-

ты различаются: в аорте пациентов с ДАК содержание незрелого коллагена снижено [6], а экспрессия матричных металлопротеиназ MMP2 и MMP9 увеличена по сравнению с пациентами с ТАК [19, 20], в то время как экспрессия тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (TIMP1), по разным данным, снижена [20] или не различается [19]. Изменения внеклеточного вещества средней оболочки аорты при ее аневризмах разного происхождения в настоящее время активно изучаются. Показано, что в морфофункциональных изменениях меди аорты значительную роль играет патология и ее мышечно-эластических единиц, в частности за счет своеобразного амилоидоза стенки крупных артерий, в этом процессе принимает участие не только амилоид-бета (A β), но и MFG-E8 (лактадгерин – Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor VIII) и его фрагмент Medin, секретируемые ГМК сосудов [21, 22].

Предполагается, что у пациентов с ДАК ГМК находятся в состоянии так называемого эндотелиально-эпителиально-мезенхимального (EndMT/EMT) перехода, связанного с нестабильностью клеточных контактов, изменением полярности и подвижности клеток путем реорганизации цитоскелета [23]. Нарушение регуляции EndMT/EMT с активацией сигнального пути NOTCH во время эмбриогенеза полулунных клапанов и восходящей аорты у пациентов с ДАК приводит к незре-

лости и нестабильности аорты, которая в дальнейшем под воздействием нефизиологической асимметричной гемодинамической нагрузки может вызывать ее дилатацию [10, 23]. Кроме того, у пациентов с ДАК гены EndMT/EMT регулируются особым набором miRNA, отличающимся от такового у пациентов с ТАК, в частности miR-200 регулирует гены EndMT/EMT, специфичные для ДАК, но не связанные с ТАК [10].

Считается, что для ГМК пациентов с ДАК характерен фенотип незавершенной дифференцировки со снижением экспрессии сократительных белков, например α SMA и смутелина, по сравнению с пациентами с ТАК, независимо от дилатации аорты [8, 9, 16]. Анализ секретома ГМК меди аорты пациентов с ее аневризмой с помощью масс-спектрометрии выявил различия между пациентами с ДАК и ТАК по 38 белкам: в частности, у пациентов с ДАК подавлена экспрессия семи белков, а 30 белков активирована, в том числе ассоциированных с трансформирующим фактором роста (TGF)- β [24]. Более того, исследование протеома образцов интимы и меди восходящей аорты у пациентов с ДАК и ТАК обнаружило и количественно определило экспрессию 2894 белков, которые группировались в два разных кластера, что подтверждает наличие разных профилей экспрессии белков в стенке аорты у этих пациентов [23]. В частности, аорта пациентов с ДАК характеризуется нестабильностью и повышенной проницаемостью эндотелиальной базальной мембраны еще до расширения аорты: низкое содержание ламинина γ 1 и подавление экспрессии эндотелиального соединительного белка CD31 (PECAM1), вероятно, ослабляет функцию эндотелиального барьера, в то время как у пациентов с ТАК эндотелий теряет целостность по мере расширения аорты [10].

Снижение плотности распределения *vasa vasorum*, зарегистрированное в нашей работе у пациентов с ДАК, совпадает с данными ряда авторов, описывающих значительное подавление экспрессии ключевых ангиогенных факторов (VEGFA, VEGFC, VEGFR1, NRP1, NRP2) у пациентов с ДАК и дилатированной аортой [23], что предполагает подавление ангиогенеза у этих пациентов.

Заключение

У пациентов с двустворчатым аортальным клапаном показания к оперативному вмешательству возникают в более молодом возрасте по сравнению с пациентами с трехстворчатым аортальным клапаном и при менее выраженных изменениях морфологии стенки восходящей аорты и характеризуются хаотичным расположением гладкомышечных клеток, фрагментацией эластических волокон, наличием *vasa vasorum* во внутренних отделах меди. Это может свидетельствовать о более выраженной несостоятельности стенки аорты у пациентов с двустворчатым аортальным клапаном по сравнению с пациентами с трехстворчатым аортальным клапаном и ее недостаточной адаптации

к гемодинамической перегрузке при дилатации сосуда. Оценка изменений интимы аорты, а также особенностей расположения гладкомышечных клеток, фрагментации эластических волокон, определение их количества, изучение фиброза и патологии *vasa vasorum* в средней оболочке аорты при ее аневризме могут явиться важным шагом к разработке объемной, стереометрической модели строения стенки аорты в норме и патологии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.А. Мироненко, Р.А. Серов, Т.В. Сухачева.

Сбор и обработка материала – М.А. Соборов, С.В. Гарманов, М.Б. Кокоев, В.А. Мироненко, Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева.

Написание текста – Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева, М.А. Соборов, Р.А. Серов.

Редактирование – Е.В. Пеняева, М.А. Соборов, Р.А. Серов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.A. Mironenko, R.A. Serov, T.V. Sukhacheva.

Collected the data and performed the analysis – M.A. Soborov, S.V. Garmanov, M.B. Kokoev, V.A. Mironenko, T.V. Sukhacheva, E.V. Penyaeva.

Wrote the paper – T.V. Sukhacheva, E.V. Penyaeva, M.A. Soborov, R.A. Serov.

Edited the manuscript – E.V. Penyaeva, M.A. Soborov, R.A. Serov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare that they have no conflict of interest.

Литература/References

1. *Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Bartolomeo RD, Eggebrecht H et al.* 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;35(41):2873–926. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu281.
2. *Титов Д.А., Муратов Р.М.* «Пограничное» расширение восходящей аорты: хирургическая тактика. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2018;19(6):780–786. DOI: 10.24022/1810-0694-2018-19-6-780-786.
Titov DA, Muratov RM. “Borderline” expansion of the ascending aorta: surgical tactics. *The Bulletin of Bakoulev Center. Cardiovascular Diseases.* 2018;19(6):780–786 (In Russ.). DOI: 10.24022/1810-0694-2018-19-6-780-786.
3. *Мироненко В.А., Соборов М.А., Городков А.Ю., Бокерия Л.А.* Особенности кровотока в аорте как критерий эффективности реконструктивных вмешательств. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2021;22(5):508–514. DOI: 10.24022/1810-0694-2021-22-5-508-514.
Mironenko VA, Soborov MA, Gorodkov AYU, Bockeria LA. Features of blood flow in the aorta as a criterion for the effectiveness of reconstructive interventions. *The Bulletin of*

- Bakoulev Center. Cardiovascular Diseases. 2021;22(5):508–514 (In Russ.). DOI: 10.24022/1810-0694-2021-22-5-508-514.
4. Verma S, Siu SC. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *New Engl J Med*. 2014;370(20):1920–9. DOI: 10.1056/NEJMra1207059.
 5. Костина Д.А., Успенский В.Е., Семенова Д.С., Костина А.С., Боярская Н.В., Иртыга О.Б. и др. Молекулярные механизмы сосудистой кальцификации. *Трансляционная медицина*. 2020;7(1):6–21. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21.
Kostina DA, Uspensky VE, Semenova DS, Kostina AS, Boyarskaya NV, Irtyuga OB et al. Role of calcification in aortic degeneration. *Translational Medicine*. 2020;7(1):6–21 (In Russ.). DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21.
 6. Phillippi JA, Green BR, Eskay MA, Kotlarczyk MP, Hill MR, Robertson AM et al. Mechanism of aortic medial matrix remodeling is distinct in patients with bicuspid aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147(3):1056–64. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.04.028.
 7. Matthias Bechtel JF, Noack F, Sayk F, Erasmi AW, Bartels C, Sievers HH. Histopathological grading of ascending aortic aneurysm: comparison of patients with bicuspid versus tricuspid aortic valve. *J Heart Valve Dis*. 2003;12(1):54–9. PMID: 12578337.
 8. Grewal N, Gittenberger-de Groot AC. Wall shear stress directional abnormalities in BAV aortas: toward a new hemodynamic predictor of aortopathy? *Front Physiol*. 2019;10:225. DOI: 10.3389/fphys.2019.00225.
 9. Grewal N, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Klautz RJ, Lindeman JH, Goumans MJ et al. Ascending aorta dilation in association with bicuspid aortic valve: a maturation defect of the aortic wall. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;148(4):1583–90. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.01.027.
 10. Freiholtz D, Bergman O, Lång K, Poujade FA, Paloschi V, Granath C et al. Bicuspid aortic valve aortopathy is characterized by embryonic epithelial to mesenchymal transition and endothelial instability. *J Mol Med (Berl)*. 2023;101(7):801–11. DOI: 10.1007/s00109-023-02316-5.
 11. Pisano C, D'Amico F, Balistreri CR, Vacirca SR, Nardi P, Altieri C et al. Biomechanical properties and histomorphometric features of aortic tissue in patients with or without bicuspid aortic valve. *J Thorac Dis*. 2020;12(5):2304–16. DOI: 10.21037/jtd.2020.03.122.
 12. Agnese V, Pasta S, Michelenia HI, Minà C, Romano GM, Carerj S et al. Patterns of ascending aortic dilatation and predictors of surgical replacement of the aorta: a comparison of bicuspid and tricuspid aortic valve patients over eight years of follow-up. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;135:31–9. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.07.010.
 13. Della Corte A, Quarto C, Bancone C, Castaldo C, Di Meglio F, Nurzynska D et al. Spatiotemporal patterns of smooth muscle cell changes in ascending aortic dilatation with bicuspid and tricuspid aortic valve stenosis: focus on cell-matrix signaling. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(1):8–18,18.e1-2. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.09.009.
 14. Takaichi S, Yutani C, Fujita H, Yamamoto A. Ultrastructural studies on the phenotypic modulation of human intimal smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1993;100(2):197–211. DOI: 10.1016/0021-9150(93)90206-a.
 15. Collins JA, Munoz JV, Patel TR, Loukas M, Tubbs RS. The anatomy of the aging aorta. *Clin Anat*. 2014;27(3):463–6. DOI: 10.1002/ca.22384.
 16. Grewal N, Girdauskas E, DeRuiter M, Goumans MJ, Poelmann RE, Klautz RJM et al. The role of hemodynamics in bicuspid aortopathy: a histopathologic study. *Cardiovasc Pathol*. 2019;41:29–37. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.03.002.
 17. Бокерия Л.А., Серов П.А., Рычин С.В. Морфологическая характеристика изменений стенки восходящей аорты при ее аневризматическом расширении у больных с синдромом Марфана. *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания*. 2016;17(5):19–28. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=27204386> (получено 29.07.2024).
Bockeria LA, Serov PA, Rychin SV. Morphological changes characteristic of the ascending aorta wall at its aneurysmal dilatation in patients with Marfan syndrome. *The Bulletin of Bakoulev Center. Cardiovascular Diseases*. 2016;17(5):19–28 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=27204386> (accessed 29.07.2024).
 18. Новикова Е.Г., Галанкина И.Е. Морфологические особенности возрастных изменений в стенке аорты при расслаивающей аневризме. *Архив патологии*. 2015;77(1):18–22. DOI: 10.17116/patol201577118.
Novikova EG, Galankina IE. Age-related morphological changes in the aortic wall in dissecting aneurysm. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2015;77(1):18–22 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201577118.
 19. Boyum J, Fellingner EK, Schmoker JD, Trombley L, McPartland K, Ittleman FP et al. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(3):686–91. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.11.049.
 20. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(4):1028–36. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.10.083.
 21. Wang M, McGraw KR, Monticone RE. Milk fat globule epidermal growth factor VIII fragment medin in age-associated arterial adverse remodeling and arterial disease. *Cells*. 2023;12(2):253. DOI: 10.3390/cells12020253.
 22. Whitehead M, Yusoff S, Ahmad S, Schmidt L, Mayr M, Madine J et al. Vascular smooth muscle cell senescence accelerates medin aggregation via small extracellular vesicle secretion and extracellular matrix reorganization. *Aging Cell*. 2023;22(2):e13746. DOI: 10.1111/accel.13746.
 23. Maleki S, Kjellqvist S, Paloschi V, Magné J, Branca RM, Du L et al. Mesenchymal state of intimal cells may explain higher propensity to ascending aortic aneurysm in bicuspid aortic valves. *Sci Rep*. 2016;6:35712. DOI: 10.1038/srep35712.
 24. Rocchiccioli S, Cecchetti A, Panesi P, Farneti PA, Mariani M, Ucciferri N et al. Hypothesis-free secretome analysis of thoracic aortic aneurysm reinforces the central role of TGF- β cascade in patients with bicuspid aortic valve. *J Cardiol*. 2017;69(3):570–6. DOI: 10.1016/j.jjcc.2016.05.007.

Информация об авторах

Татьяна Владимировна Сухачева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела патологической анатомии НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Елена Владимировна Пеняева – старший научный сотрудник отдела патологической анатомии НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева.

Марк Алексеевич Соболев – кандидат медицинских наук, научный сотрудник кардиохирургического отделения № 8 НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, научный сотрудник Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Сергей Владимирович Гарманов – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник кардиохирургического отделения № 8 НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева.

Мурат Бексултанович Кокоев – кандидат медицинских наук, научный сотрудник кардиохирургического отделения № 8 НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева.

Владимир Александрович Мироненко – доктор медицинских наук, заведующий кардиохирургическим отделением № 8 НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева.

Роман Андреевич Серов – доктор медицинских наук, профессор, врач-патологоанатом, заведующий патологоанатомическим отделением НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева.

Author information

Tatiana V. Sukhacheva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Anatomic Pathology, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery; Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-6127-8688>

Elena V. Penyaeva – Senior Researcher, Department of Anatomic Pathology, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery.

<https://orcid.org/0000-0001-9692-2322>

Mark A. Soborov – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Cardiac Surgery Department No. 8, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery; Researcher, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-8387-0524>

Sergey V. Garmanov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Cardiac Surgery Department No. 8, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery.

<https://orcid.org/0000-0001-8568-9043>

Murat B. Kokoev – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Cardiac Surgery Department No. 8, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery.

<https://orcid.org/0000-0001-9765-4980>

Vladimir A. Mironenko – Dr. Sci. (Med.), Head of the Cardiac Surgery Department No. 8, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery.

<https://orcid.org/0000-0003-1533-6212>

Roman A. Serov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathologist, Head of the Department of Anatomic Pathology, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery.

<https://orcid.org/0000-0002-7962-7273>

© Shakhpazyan N.K., Mikhaleva L.M., Sadykhov N.K., Bedzhanyan A.L., Gioeva Z.V., Mikhalev A.I.,
Pechnikova V.V., Midiber K.Yu., Orekhov A.N., 2024

DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.29-35

Altered proinflammatory cytokine response in colorectal cancer patients: insights into immune dysregulation

*N.K. Shakhpazyan¹, L.M. Mikhaleva¹, N.K. Sadykhov¹, A.L. Bedzhanyan²,
Z.V. Gioeva¹, A.I. Mikhalev³, V.V. Pechnikova¹, K.Yu. Midiber^{1,4}, A.N. Orekhov¹*

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

² Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Colorectal cancer (CRC) is one of the most common oncological diseases, the pathogenesis of which is closely associated with the development of inflammation. The study of inflammation regulation, including the balance of pro- and antiinflammatory cytokines, is a promising topic for research, allowing for a deeper understanding of the pathogenesis of CRC and improving clinical approaches to the treatment for and diagnosis of this disease. This study investigates the altered secretion of proinflammatory cytokines, i.e., TNF- α and IL-1 β , in CRC patients, aiming to elucidate immune dysregulation mechanisms. We sought to investigate the secretion characteristics of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β), in patients with CRC.

Materials and methods. We enrolled 25 newly diagnosed CRC patients and 20 age- and sex-matched controls. Monocytes were isolated from the peripheral blood of participants using magnetic separation based on the CD14 marker. The isolated monocytes were cultured and subjected to dual stimulation with bacterial lipopolysaccharide at 24 hours and 7 days, followed by quantitative measurement of basal and stimulated cytokine levels using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. We revealed a significant reduction in TNF- α secretion in CRC monocytes after initial LPS stimulation, with no subsequent recovery upon restimulation. In contrast, IL-1 β secretion elevated markedly in CRC patients, particularly after restimulation. These results suggest an impaired TNF- α response and an exacerbated IL-1 β response in CRC, indicating a potential immune tolerance mechanism that may contribute to tumor progression. The distinct cytokine dynamics observed point at complex immune dysregulation within the CRC microenvironment.

Conclusion. The observed cytokine secretion patterns may indicate immune dysregulation in the microenvironment of CRC. Our study underscores the importance of understanding the specific roles of cytokines in CRC pathogenesis and highlights the potential for targeted therapeutic interventions to modulate these immune responses. Further research is necessary to explore the underlying signaling pathways and the broader implications of these findings for CRC treatment strategies. This work provides critical insights into the pro-inflammatory cytokine profiles in CRC, advancing our understanding of the immune landscape in cancer and opening new avenues for therapeutic exploration.

Keywords: colorectal cancer, cytokines, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, immune tolerance

Corresponding author: Nikolay K. Shakhpazyan. E-mail: shakhpazyan@gmail.com

For citation: Shakhpazyan N.K., Mikhaleva L.M., Sadykhov N.K., Bedzhanyan A.L., Gioeva Z.V., Mikhalev A.I., Pechnikova V.V., Midiber K.Yu., Orekhov A.N. Altered proinflammatory cytokine response in colorectal cancer patients: insights into immune dysregulation. *Clin. exp. morphology.* 2024;13(4):29–35. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.29-35.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Russian Academy of Sciences, Petrovsky National Research Centre of Surgery (No. FURG-2023-0104, 224013000855-2, FURG-2024-0027, 124021600057-0).

Received 10.06.2024. **Received in revised form** 19.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Измененный провоспалительный цитокиновый ответ у пациентов с колоректальным раком как признак иммунной дисрегуляции

Н.К. Шахпазян¹, Л.М. Михалева¹, Н.К. Садыхов¹, А.Л. Беджанян²,
З.В. Гиоева¹, А.И. Михалев³, В.В. Печникова¹, К.Ю. Мидибер^{1,4}, А.Н. Орехов¹

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

² ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Колоректальный рак является одним из самых распространенных онкологических заболеваний, чей патогенез тесно связан с развитием воспаления. Изучение регуляции воспаления, в том числе баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, – перспективная тема для исследования, позволяющая глубже понять патогенез колоректального рака и улучшить клинические подходы в лечении и диагностике этого заболевания. В данной работе изучена секреция провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкин-1 бета (IL-1 β), у пациентов с колоректальным раком с целью выяснения механизма иммунной дисрегуляции.

Материалы и методы. Проведено исследование особенностей секреции провоспалительных цитокинов – TNF- α и IL-1 β у пациентов с колоректальным раком. В исследование были включены 25 пациентов с колоректальным раком и 20 сопоставимых по возрасту и полу участников из группы сравнения. Из периферической крови участников методом магнитной сепарации по маркеру CD14 были выделены моноциты. Моноциты культивировали и подвергли двойному стимулированию бактериальным липополисахаридом через 24 часа и через 7 суток с количественным определением базальных и стимулированных уровней цитокинов иммуноферментным методом.

Результаты. Результаты исследования показали значительное снижение секреции TNF- α в культуре моноцитов после первоначального стимулирования липополисахаридом без последующего восстановления уровня секреции при повторной стимуляции. Секреция IL-1 β , напротив, была значительно повышена у пациентов с колоректальным раком, особенно после повторной стимуляции. Эти результаты свидетельствуют об измененном цитокиновом ответе, выражающемся в истощении секреции TNF- α и усиленной секреции IL-1 β у пациентов с колоректальным раком, что может способствовать развитию иммунной толерантности опухоли.

Заключение. Наблюдаемая особенность секреции цитокинов может указывать на иммунную дисрегуляцию в микроокружении колоректального рака. Наше исследование подчеркивает значимость изучения роли цитокинов в патогенезе колоректального рака и может быть основой для изучения терапевтической коррекции изменений цитокинового ответа у пациентов с колоректальным раком.

Ключевые слова: колоректальный рак, цитокины, фактор некроза опухоли-альфа, интерлейкин-1 бета, иммунная толерантность

Для корреспонденции: Николай Константинович Шахпазян. E-mail: shakhpazyan@gmail.com

Для цитирования: Шахпазян Н.К., Михалева Л.М., Садыхов Н.К., Беджанян А.Л., Гиоева З.В., Михалев А.И., Печникова В.В., Мидибер К.Ю., Орехов А.Н. Измененный провоспалительный цитокиновый ответ у пациентов с колоректальным раком как признак иммунной дисрегуляции. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):29–35 (англ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.29-35.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Российской академии наук Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (№ FURG-2023-0104, 224013000855-2, FURG-2024-0027, 124021600057-0).

Статья поступила 10.06.2024. Получена после рецензирования 19.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) represents a significant global health burden ranking as the third most common cancer worldwide. The pathogenesis of CRC is complex and in-

volves a multifaceted interplay between genetic, environmental, and immunological factors. Central to this process is the tumor microenvironment (TME) which includes various cellular and molecular components that collectively

influence cancer progression. Among these components, inflammation plays a crucial role in both the initiation and progression of CRC.

Inflammation is increasingly recognized as a key factor in the development of many cancers, including CRC. Chronic inflammation in the colon, as seen in conditions such as inflammatory bowel disease, significantly elevates the risk of developing CRC [1]. This is largely due to the persistent presence of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and other mediators that can induce genetic mutations and promote a favorable environment for tumorigenesis.

Macrophages, a critical component of the immune system, are highly plastic cells capable of adopting various functional phenotypes in response to environmental signals. In the context of CRC, macrophages can exhibit either a pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype. M1 macrophages are characterized by their ability to produce high levels of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , which can promote anti-tumor immunity. Conversely, M2 macrophages are associated with tissue repair and immunosuppression, often contributing to tumor growth and metastasis by secreting anti-inflammatory cytokines and growth factors [2, 3].

The role of macrophage reactivity and cytokine secretion in CRC is of particular interest. Pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-1 β , play pivotal roles in modulating the immune response and influencing the behavior of other cells within the TME. TNF- α is involved in promoting inflammation and apoptosis, while IL-1 β is known to enhance the inflammatory response and has been implicated in contributing to angiogenesis and tumor invasiveness [4, 5].

In CRC, the balance between these cytokines can significantly impact disease progression. Dysregulated cytokine production can lead to chronic inflammation that supports tumor growth and immune evasion. For instance, elevated levels of IL-1 β have been associated with increased tumor aggressiveness and poorer prognosis in CRC patients [6]. Similarly, aberrant TNF- α signaling has been linked to both tumor-promoting and tumor-suppressing effects, depending on the context and timing of its expression [7, 8].

Understanding the dynamics of cytokine secretion and macrophage reactivity in CRC is crucial for developing targeted therapies aimed at modulating the immune response. By elucidating the mechanisms underlying the altered cytokine profiles in CRC patients, we can identify potential biomarkers for disease progression and therapeutic targets to improve patient outcomes. This study aimed to provide insights into specific alterations in TNF- α and IL-1 β secretion by monocytes in CRC patients, shedding light on the complex interplay between inflammation and cancer.

Materials and methods

Study participants

The study encompassed 45 participants: 25 newly diagnosed colorectal adenocarcinoma patients and 20 age-

and sex-matched controls. We excluded subjects with specific acute and chronic diseases. Only individuals who had not yet undergone any therapeutic interventions, such as chemotherapy, or radiation therapy, were included. All procedures, including comprehensive post-operative pathomorphological analysis, adhered to the 1975 Helsinki Declaration and its 2013 update. All stages of the study comply with the legislation of the Russian Federation and regulatory documents of the research organization. Written informed consents were obtained from all participants. The research protocol No. 8 was approved by the local ethical committee of the Petrovsky National Research Center of Surgery on October 20, 2022.

Monocyte culture isolation and double lipopolysaccharide stimulation assay

Mononuclear cells were isolated from 30-ml blood samples via Ficoll density gradient centrifugation, followed by CD14+ cell immunomagnetic separation using LS Columns and CD14+ MicroBeads (Miltenyi Biotec Inc., USA). Isolated CD14+ monocytes were cultured at 1,000,000 cells/ml in X-VIVO serum-free medium (Lonza, Switzerland) with L-glutamine, gentamicin, and phenol red, at 37°C and 5% CO₂. Triplicate cultures were established per patient. Lipopolysaccharides (LPSs) from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, USA) were used for stimulation at a concentration of 1 μ g/ml. Two healthy patients received LPS on day 1, with the third serving as a control. Cytokine levels were assessed at 24-hour intervals and after a medium refresh. Restimulation with LPS occurred in one healthy individual on day 6. The medium was collected on day 7 for final cytokine analysis and stored at -70°C until assayed for TNF- α and IL-1 β concentrations.

Measurement of TNF- α and IL-1 β concentrations

TNF- α and IL-1 β concentrations in the culture medium were quantified using ELISA kits (Human TNF-alpha/TNFSF1A DuoSet ELISA and Human IL-1beta/IL-1F2 DuoSet ELISA; R&D Systems Inc., USA). Assessments included the following figures: 1) basal cytokine levels after 24 hours without LPS (nonstimulated), 2) cytokine levels after 24 hours of LPS stimulation (first stimulation), 3) basal cytokine levels on day 7 in cultures not restimulated with LPS (non-restimulated), and 4) cytokine levels on day 7 following a 24-hour LPS restimulation (restimulation).

Statistical analysis

We performed statistical analysis using SPSS Statistics v. 26.0. Data distribution and differences between the CRC and control groups were assessed with the Shapiro-Wilk test and Mann-Whitney U-test, respectively. Quantitative results are presented as median and interquartile range.

Results

Table 1 provides characteristics of study participants.

In our study, we aimed to investigate the differential cytokine responses of blood monocytes in CRC patients

Table 1 | Таблица 1

Characteristics of study participants | Характеристика участников исследования

| Characteristics Характеристика | Control Group (n=20) Группа сравнения | CRC Patients (n=25) Пациенты с КРП |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|
| Age (years) Возраст (лет) | 58 (56–63) | 61 (59–65) |
| Sex, M/F Пол, м/ж | 13/7 | 14/11 |
| CRC Stage: Стадия КРП | | |
| T3N0M0 | – | 12 |
| T3N1aM0 | – | 6 |
| T1N0M0 | – | 2 |
| T3N2bM1a | – | 1 |
| T3N1cM0 | – | 1 |
| T4bN2aM0 | – | 1 |
| T4bN2bM1c | – | 1 |
| T4bN2bM0 | – | 1 |

CRC – colorectal cancer | КРП – колоректальный рак

and healthy controls to LPS stimulation. We focused on TNF- α and IL-1 β , given their pivotal roles in modulating tumor inflammation and their distinct cellular mechanisms [9, 10].

Upon LPS stimulation, we found that monocytes from CRC patients exhibited an initial secretion of TNF- α , followed by an exhaustion in its secretion. Specifically, a lower basal level was observed after a 7-day culture and minimal increase upon LPS restimulation (Table 2). Conversely, IL-1 β secretion showed elevated baseline levels and increased responsiveness to restimulation in CRC patients (Table 2).

Discussion

Our study elucidates differential cytokine secretion patterns in blood monocytes from CRC patients as compared to that in healthy controls. Specifically, monocytes in CRC show an exhaustion in TNF- α secretion and an elevated IL-1 β secretion following LPS stimulation. These cytokines serve distinct roles in inflammatory processes, regulated via unique pathways and kinetic profiles [11–13]. We revealed a marked reduction in TNF- α secretion by monocytes in CRC patients after initial LPS stimulation, with no significant recovery upon restimulation. This suggests a potential exhaustion or dysfunction of monocytes, which could impair the body's ability to mount an effective inflammatory

Table 2 | Таблица 2

Levels of TNF- α and IL-1 β Secretion | Уровень секреции TNF- α и IL-1 β

| | | Control Group Группа сравнения | CRC patients Пациенты с КРП | p (U-test) p (U-тест) |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| TNF- α concentration (pg/ml) Концентрация TNF- α (пг/мл) | | | | |
| Level at 24 hours Уровень через 24 часа | Nonstimulated Нестимулированный | 135 (89–199) | 97 (79–134) | 1.0 |
| | First LPS stimulation Первая стимуляция ЛПС | 3,356 (2,740–5,030) | 4,503 (2,532–7,148) | 0.222 |
| Level at 7 days Уровень через 7 дней | Non-restimulated Нерестимулированный | 148 (99–169) | 4 (2–5) | 0.001* |
| | Restimulation with LPS Рестимуляция ЛПС | 141 (92–185) | 7 (4–9) | 0.001* |
| IL-1 β concentration (pg/ml) Концентрация IL-1 β (пг/мл) | | | | |
| Level at 24 hours Уровень через 24 часа | Nonstimulated Нестимулированный | 114 (66–208) | 274 (264–328) | 0.001* |
| | First LPS stimulation Первая стимуляция ЛПС | 984 (856–1,101) | 1,258 (1,198–1,581) | 0.008* |
| Level at 7 days Уровень через 7 дней | Non-restimulated Нерестимулированный | 120 (106–147) | 187 (175–203) | 0.001* |
| | Restimulation with LPS Рестимуляция ЛПС | 123 (82–148) | 248 (215–288) | 0.001* |

LPS – lipopolysaccharide; CRC – colorectal cancer | ЛПС – липополисахарид; КРП – колоректальный рак.

* Statistically significant difference between the control group and CRC patients | * Статистически значимые различия между группой сравнения и пациентами с КРП

response against tumor cells. The inability to sustain TNF- α production could facilitate immune evasion by the tumor, contributing to its progression and metastasis. Conversely, IL-1 β secretion was significantly elevated in colorectal cancer patients, especially following restimulation. IL-1 β is known to enhance inflammatory responses and has been implicated in promoting tumor invasiveness and angiogenesis. The heightened IL-1 β levels may reflect a state of chronic inflammation within the colorectal cancer microenvironment, which could support tumor growth and spread.

The exhaustion of TNF- α secretion could indicate an impaired proinflammatory response, facilitating immune evasion by tumor cells. TNF- α plays a dual role in cancer, potentially promoting antitumor immunity through its inflammatory effects, while also being capable of promoting tumor growth under certain conditions [7, 8]. The inability of monocytes to sustain TNF- α production in CRC patients may impair effective immune surveillance and response, contributing to tumor progression.

The TNF- α pathway, primarily modulated through NF- κ B signaling, is involved in acute inflammation and cellular survival mechanisms, including apoptosis via Fas receptors [11].

IL-1 β is a potent proinflammatory cytokine that activates immune cells and is regulated through the NLRP3 inflammasome pathway [10]. In our findings, IL-1 β secretion was significantly elevated in CRC patients, particularly after restimulation with LPS. This heightened IL-1 β level suggests a state of chronic inflammation within the CRC microenvironment, which is conducive to tumor growth and metastasis. IL-1 β has been implicated in promoting angiogenesis, tumor invasiveness, and creating a protumorigenic inflammatory milieu [14]. The elevated IL-1 β in CRC patients could thus reflect an environment that supports cancer cell survival and dissemination.

IL-1 β , conversely, activates immune cells and is regulated through the NLRP3 inflammasome pathway [12, 13]. The secretion kinetics of these cytokines are divergent as well, with TNF- α peaking within 1–2 hours after LPS exposure and IL-1 β reaching a peak at 4–6 hours [11–13].

These findings raise questions about altered immune responses in CRC. Monocytes in CRC patients may undergo a form of “tolerization,” reducing their efficacy against tumors and potentially fueling the tumor microenvironment. The abnormal cytokine secretion patterns observed underscore the complexity of CRC pathogenesis and the role of chronic inflammation therein.

The altered secretion profiles in CRC potentially align with the theory that CRC is an inflammation-associated malignancy. This leads us to several hypotheses that warrant further investigation:

1. Acquired immune tolerance in monocytes could serve as a protective mechanism for tumor cells against immune attack [15, 16]. This could particularly be relevant given that IL-1 β secretion is elevated in CRC patients, necessitating a broader cytokine panel for a complete understanding.

2. Abnormalities in key signaling pathways such as NF- κ B and MAPK in monocytes could be pivotal in understanding the observed phenotypes [17].
3. The tumor microenvironment, a dynamic entity involving various soluble factors and exosomes, could influence the reduced TNF- α resecretion [18].
4. A depletion in monocyte count in CRC patients could also contribute to the observed exhaustion of TNF- α secretion [19].
5. CRC-associated alterations in gut microbiota and intestinal permeability could be influencing monocyte interactions and subsequent cytokine secretion [20].

Collectively, these results and hypotheses open up new avenues for future research aimed at elucidating the complex interplay between inflammation, immune responses, and CRC pathogenesis. To fully understand the altered cytokine dynamics, further research should explore the signaling pathways involved in TNF- α and IL-1 β regulation. Investigating the roles of NF- κ B, MAPK, and NLRP3 inflammasome pathways could provide deeper insights into the molecular mechanisms driving these changes. Expanding the cytokine panel to include other pro- and antiinflammatory mediators will help delineate the complex network of immune interactions in CRC. This could identify additional biomarkers for disease progression and potential therapeutic targets.

Longitudinal studies assessing cytokine levels throughout the course of CRC treatment could elucidate their prognostic value and guide the development of personalized immunotherapy strategies. Monitoring cytokine profiles may also help predict patient responses to existing therapies and improve treatment outcomes.

Understanding how the tumor microenvironment influences monocyte function and cytokine secretion will be crucial. Factors such as hypoxia, tumor-derived exosomes, and stromal cell interactions likely play significant roles in shaping the immune response in CRC.

Conclusion

The altered cytokine response observed in colorectal cancer patients highlights a significant dysregulation in immune function that may contribute to tumor progression. Our findings underscore the importance of cytokines, particularly TNF- α and IL-1 β , in modulating the immune landscape within the colorectal cancer microenvironment.

The observed cytokine profile suggests that monocytes in colorectal cancer patients may undergo a form of “tolerization,” reducing their efficacy in attacking tumor cells and potentially fostering a more permissive environment for tumor development. This immune tolerance could be a strategic adaptation by the tumor to evade immune surveillance.

These results indicate that targeting cytokine responses could be a viable strategy for colorectal cancer treatment. Modulating the immune response to restore effec-

tive TNF- α production while controlling excessive IL-1 β secretion might improve antitumor immunity and inhibit tumor progression. Future therapies could focus on reversing monocyte exhaustion and reactivating their proinflammatory functions.

In conclusion, this study provides critical insights into the proinflammatory cytokine profiles in colorectal cancer, advancing our understanding of the immune dysregulation associated with cancer progression. These findings expand possibilities for therapeutic exploration aimed at modulating immune responses to improve patient outcomes in colorectal cancer.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Author contributions

Planned the study and the experiment – N.K. Shakhpazyan, A.N. Orekhov, A.L. Bedzhanyan.

Data collection and analysis – N.K. Sadykhov, Z.V. Goeva, V.V. Pechnikova, K.Yu. Midiber.

Wrote the paper – N.K. Shakhpazyan.

Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, A.I. Mikhalev.

Вклад авторов

Планирование исследования и экспериментов – Н.К. Шахпазян, А.Н. Орехов, А.Л. Беджаниян.

Сбор и анализ данных – Н.К. Садыхов, З.В. Гоева,

В.В. Печникова, К.Ю. Мидибер.

Написание текста – Н.К. Шахпазян.

Редактирование – Л.М. Михалева, А.И. Михалев.

References/Литература

- Burgos-Molina AM, Téllez Santana T, Redondo M, Bravo Romero MJ. The crucial role of inflammation and the immune system in colorectal cancer carcinogenesis: a comprehensive perspective. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):6188. DOI: 10.3390/ijms25116188.
- Unuvar Purcu D, Korkmaz A, Gunalp S, Helvacı DG, Erdal Y, Dogan Y et al. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLoS One.* 2022;17(3):e0265196. DOI: 10.1371/journal.pone.0265196.
- Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):389. DOI: 10.1186/s12935-021-02089-2.
- Hou S, Zhao Y, Chen J, Lin Y, Qi X. Tumor-associated macrophages in colorectal cancer metastasis: molecular insights and translational perspectives. *J Transl Med.* 2024;22(1):62B. DOI: 10.1186/s12967-024-04856-x.
- Braumüller H, Mauerer B, Andris J, Berlin C, Wieder T, Kesselring R. The cytokine network in colorectal cancer: implications for new treatment strategies. *Cells.* 2022;12(1):138. DOI: 10.3390/cells12010138.
- Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1791. DOI: 10.3390/cancers12071791.
- Laha D, Grant R, Mishra P, Nilubol N. The role of tumor necrosis factor in manipulating the immunological response of tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12:656908. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656908.
- Lu L, Shi W, Deshmukh RR, Long J, Cheng X, Ji W et al. Tumor necrosis factor- α sensitizes breast cancer cells to natural products with proteasome-inhibitory activity leading to apoptosis. *PLoS One.* 2014;9(11):e113783. DOI: 10.1371/journal.pone.0113783.
- Yao D, Dong M, Dai C, Wu S. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(10):1595–602. DOI: 10.1093/ibd/izz149.
- Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3328. DOI: 10.3390/ijms20133328.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017;9(6):7204–18. DOI: 10.18632/oncotarget.23208.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:e17023. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Shalapour S, Karin M. Pas de deux: control of anti-tumor immunity by cancer-associated inflammation. *Immunity.* 2019;51(1):15–26. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.06.021.
- Zhang J, Veeramachaneni N. Targeting interleukin-1 β and inflammation in lung cancer. *Biomark Res.* 2022;10(1):5. DOI: 10.1186/s40364-021-00341-5.
- Murray PJ. Immune regulation by monocytes. *Semin Immunol.* 2018;35:12–8. DOI: 10.1016/j.smim.2017.12.005.
- Brands X, Haak BW, Klarenbeek AM, Butler J, Uhel F, Qin W et al. An epigenetic and transcriptomic signature of immune tolerance in human monocytes through multi-omics integration. *Genome Med.* 2021;13(1):131. DOI: 10.1186/s13073-021-00948-1.
- He X, Wei Z, Zhou E, Chen L, Kou J, Wang J et al. Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):470–6. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.012.
- Liguori M, Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages as incessant builders and destroyers of the cancer stroma. *Cancers (Basel).* 2011;3(4):3740–61. DOI: 10.3390/cancers3043740.
- Schumak B, Klocke K, Kuepper JM, Biswas A, Djie-Maletz A, Limmer A et al. Specific depletion of Ly6C(hi) inflammatory monocytes prevents immunopathology in experimental cerebral malaria. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124080. DOI: 10.1371/journal.pone.0124080.
- Campbell C, Kandalgaonkar MR, Golonka RM, Yeoh BS, Vijay-Kumar M, Saha P. Crosstalk between gut microbiota and host immunity: impact on inflammation and immunotherapy. *Biomedicines.* 2023;11(2):294B. DOI: 10.3390/biomedicines11020294.

Author information

Nikolay K. Shakhpazyan – Cand. Sci. (Med.), Head of the Group of Molecular Biology and Genetics with Functions of Biometrics, Biomedicine, and Biomedical Statistics, Reference Center for Infectious and Viral Oncopathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-3386-7746>

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>

Nikolay K. Sadykhov – Senior Researcher, Group of Molecular Biology and Genetics with Functions of Biometrics, Biomedicine, and Biomedical Statistics, Reference Center for Infectious and Viral Oncopathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-3800-1506>

Arkady L. Bedzhanyan – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Abdominal Surgery and Oncology II (Coloproctology and Uro-Gynecology), Petrovsky National Research Centre of Surgery.
<https://orcid.org/0000-0002-4377-0035>

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Head of the Central Pathological Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-5456-8692>

Alexander I. Mikhalev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Hospital Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-9463-8229>

Valentina V. Pechnikova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-5896-4556>

Konstantin Yu. Midiber – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathology Group, Reference Center for Infectious and Viral Oncopathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”; Assistant, Department of Anatomic Pathology, Medical Institute, Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University of Russia.
<https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>

Alexander N. Orekhov – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-3318-4681>

Информация об авторах

Николай Константинович Шахпазян – кандидат медицинских наук, заведующий группой молекулярной биологии и генетики с функциями биометрии, биомедицины и биомедицинской статистики референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии 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.

Николай Кязимович Садыхов – старший научный сотрудник группы молекулярной биологии и генетики с функциями биометрии, биомедицины и биомедицинской статистики референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Аркадий Лаврентьевич Беджаниян – доктор медицинских наук, заведующий отделением абдоминальной хирургии и онкологии II (колопроктологии и урогинекологии) РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Зарина Владиславовна Гиеова – кандидат медицинских наук, заведующая центральной патологоанатомической лабораторией НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александр Иванович Михалев – доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии № 2 РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Валентина Викторовна Печникова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Константин Юрьевич Мидибер – кандидат медицинских наук, заведующий группой патоморфологии референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, ассистент кафедры патологической анатомии медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы.

Александр Николаевич Орехов – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Влияние ибупрофена на остеогенные свойства матриксов, несущих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*

И.А. Недорубова¹, В.О. Черномырдина^{1,2}, А.Ю. Меглей^{1,2}, В.П. Басина¹,
В.С. Кузнецова^{1,2}, А.В. Васильев^{1,2}, Т.Е. Григорьев^{3,4}, Ю.Д. Загоскин³,
С.Н. Чвалун³, Д.В. Гольдштейн¹, Т.Б. Бухарова¹

¹ ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

Резюме. Введение. Разработка ген-активированных остеопластических материалов открывает новые возможности для эффективного лечения пациентов с дефицитом костной ткани.

Материалы и методы. Исследование проводили с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани крыс. Были получены матриксы на основе полилактидных гранул (PLA-гранул), коллагена I типа и фибрина, импрегнированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) и ибупрофеном. Адгезию клеток на матриксах оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Кинетику высвобождения аденовирусов исследовали методом спектрофотометрии, а ибупрофена – УФ-спектрофотометрии. Эффективность остеогенной дифференцировки клеток оценивали по экспрессии генов остеогенных маркеров методом ПЦР в режиме реального времени, продукции белков остеоиндукторов методом иммуноферментного анализа, по активности щелочной фосфатазы и минерализации внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс, при окрашивании ализариновым красным.

Результаты. Добавление ибупрофена во время трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс, аденовирусами с геном *BMP2* не только способствовало эффективной доставке целевого гена и продукции белка *BMP-2*, но и обеспечивало более выраженную остеогенную дифференцировку клеток. Включение ибупрофена в состав матриксов на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибрина позволило добиться длительного высвобождения препарата из материала. Разработанные матриксы, импрегнированные Ad-*BMP2* и ибупрофеном, характеризуются высокими адгезионными свойствами. Вирусы, высвобождающиеся из матриксов, эффективно трансдуцировали клетки и индуцировали остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс.

Заключение. Полученные матриксы, содержащие аденовирусные конструкции с геном *BMP2* и ибупрофеном, обладают остеогенными свойствами *in vitro* и имеют высокий потенциал использования для лечения костных дефектов.

Ключевые слова: аденовирусные векторы, ибупрофен, костный морфогенетический белок, полилактид, коллаген, фибрин, остеогенная дифференцировка

Для корреспонденции: Ирина Алексеевна Недорубова. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Для цитирования: Недорубова И.А., Черномырдина В.О., Меглей А.Ю., Басина В.П., Кузнецова В.С., Васильев А.В., Григорьев Т.Е., Загоскин Ю.Д., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б. Влияние ибупрофена на остеогенные свойства матриксов, несущих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*. Клин. эксп. морфология. 2024;13(4):36–46. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.36-46.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147 (в области исследования свойств матриксов), в рамках государственного задания Минобрнауки России для Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова (в области наработки аденовирусных конструкций) и государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» (в области создания матриксов).

Статья поступила 03.05.2024. Получена после рецензирования 16.05.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Effect of ibuprofen on osteogenic properties of matrices carrying adenovirus with the *BMP2* gene

I.A. Nedorubova¹, V.O. Chernomyrdina^{1,2}, A.Yu. Meglei^{1,2}, V.P. Basina¹,
V.S. Kuznetsova^{1,2}, A.V. Vasilyev^{1,2}, T.E. Grigoriev^{3,4}, Yu.D. Zagoskin³,
S.N. Chvalun³, D.V. Goldshtein¹, T.B. Bukharova¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

²Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

³National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

⁴Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The development of gene-activated osteoplastic materials opens up new opportunities for effective treatment of patients with bone deficiency.

Materials and methods. The study was carried out using multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from adipose tissue of rats. We obtained matrices based on polylactide acid granules (PLA granules), type I collagen, and fibrin that were impregnated with adenovirus with the *BMP2* gene (Ad-*BMP2*) and ibuprofen. Cell adhesion on the matrices was assessed with scanning electron microscopy. The release kinetics of adenoviruses and ibuprofen was studied with spectrophotometry and UV spectrophotometry, respectively. We used real-time PCR to evaluate the efficiency of osteogenic differentiation of cells with the expression of genes of osteogenic markers; enzyme-linked immunosorbent assay to assess the production of proteins; and alizarin red staining to analyze the activity of alkaline phosphatase and the mineralization of the MSCs extracellular matrix.

Results. The addition of ibuprofen during transduction of MSCs with adenoviruses with the *BMP2* gene not only contributed to the effective delivery of the target gene and production of the BMP-2 protein, but also ensured more pronounced osteogenic differentiation of cells. The inclusion of ibuprofen in matrices based on PLA granules, type I collagen, and fibrin made it possible to achieve long-term release of the drug from the material. The developed matrices impregnated with Ad-*BMP2* and ibuprofen are characterized by high adhesive properties. Viruses released from the matrices effectively transduced cells and induced osteogenic differentiation of MSCs.

Conclusion. The developed matrices containing adenovirus with the *BMP2* gene and ibuprofen have osteogenic properties *in vitro* and a high potential use in the treatment of bone defects.

Keywords: adenoviral vectors, ibuprofen, bone morphogenetic protein, polylactide, collagen, fibrin, osteogenic differentiation

Corresponding author: Irina A. Nedorubova. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com

For citation: Nedorubova I.A., Chernomyrdina V.O., Meglei A.Yu., Basina V.P., Kuznetsova V.S., Vasilyev A.V., Grigoriev T.E., Zagoskin Yu.D., Chvalun S.N., Goldshtein D.V., Bukharova T.B. Effect of ibuprofen on the osteogenic properties of matrices carrying adenovirus with the *BMP2* gene. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):36–46 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.36-46.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-75-10147 (in the field of assessing the properties of matrices), within the framework of the State Assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics (in the field of development of adenoviral constructs) and National Research Centre “Kurchatov Institute” (in the field of creating matrices).

Received 03.05.2024. **Received in revised form** 16.05.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

В настоящее время разработка новых остеопластических материалов стала одним из ключевых направлений в области регенеративной медицины костной ткани. Многообещающим подходом является использование биорезорбируемых и биосовместимых матриц с включенными в них генетическими конструкциями, содержащими гены белков остеоиндукторов, в частности костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*). BMP-2 представляет собой основной белок, участвующий в процессе остеогенеза путем рекрутирования и стимуляции дифференцировки клеток костной тка-

ни [1]. Такие ген-активированные матрицы (ГАМ) способны стимулировать регенерацию кости, активируя естественные механизмы остеогенной дифференцировки клеток.

Для доставки гена *BMP2* в клетки могут быть использованы различные вирусные и невирусные векторы, среди которых аденовирусы имеют наибольший потенциал клинического применения при лечении заболеваний костной ткани. К преимуществам векторов на основе аденовирусов относятся высокая эффективность доставки трансгена, возможность трансдукции делящихся и неделящихся клеточных популяций,

большая пакующая емкость. Проникая в клетки, они находятся в ядре в виде эписомы, сводя к минимуму риск возникновения инсерционного мутагенеза и обеспечивая временную экспрессию гена, что является предпочтительным при разработке методов лечения дефицита костной ткани [2]. Основная проблема использования аденовирусных конструкций – возникновение иммунной реакции на вектор и, следовательно, снижение эффективности терапии и возникновение нежелательных побочных эффектов [3]. Добиться снижения иммуногенности аденовирусов можно за счет применения нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Кроме того, есть данные, свидетельствующие о том, что НПВП незначительно повышают активность щелочной фосфатазы и образование коллагена I типа на ранней стадии дифференцировки культивируемых остеобластов, что может повлиять на минерализацию кости во время регенерации [4]. В настоящее время наиболее перспективным НПВП является ибупрофен (Ibu), действие которого основано на неселективном ингибировании циклооксигеназ (ЦОГ), что приводит к снижению синтеза простагландинов и препятствует развитию воспалительного процесса [5].

Еще одним подходом к снижению реакции организма на вирусы может быть включение аденовирусных векторов внутрь матриц-носителей, труднодоступных для иммунных клеток [6], или доставка трансдуцированных клеток в составе тканеинженерных конструкций [7]. Наряду с этим использование матриц будет обеспечивать локальную доставку генетических векторов в область костного дефекта. Для получения матриц могут быть использованы природные и синтетические полимеры. При разработке методов лечения заболеваний, связанных с дефицитом костной ткани, важно, чтобы материалы обладали оптимальными механическими свойствами, были биосовместимыми и биодеградируемыми [8, 9]. Необходимыми качествами обладают матрицы на основе полилактида (PLA), скорость биодеградации которых соответствует времени восстановления костной ткани, а продукты гидролиза естественным образом выводятся из организма [10]. Основным недостаток матриц на основе гранул PLA – неспособность материала сохранять форму, поэтому добавление в качестве связующего компонента различных гидрогелей позволит заметно увеличить как механические свойства материалов, так и способность к моделированию при имплантации. В то же время ненаполненные гранулами гидрогели обладают невысокими модулями упругости и не обеспечивают необходимую остеокондукцию. Коллаген I типа (Col) представляет наибольший интерес для разработки остеопластических материалов, поскольку является одним из основных компонентов кости, а продукты его разложения могут участвовать в синтезе нового костного матрикса [11]. Наряду с этим перспективно использовать фибриновый гидрогель на основе плазмы, обогащенной тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP),

которая может быть получена у пациента и характеризуется высокой биосовместимостью. Кроме того, PRP служит источником необходимых для регенерации компонентов, таких как цитокины, факторы роста и ангиогенные факторы [12]. Матрицы на основе PLA-гранул и фибринового гидрогеля, импрегнированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* [13], показали высокую эффективность *in vivo* на модели критического дефекта теменных костей крыс. Коллаген в составе матриц может способствовать более выраженному репаративному остеогенезу.

Цель настоящей работы – исследовать влияние ибупрофена на свойства ГАМ на основе коллаген-фибринового гидрогеля и PLA-гранул, содержащих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*, *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводили с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс (ММСК ЖТ). Манипуляции с животными были одобрены локальным этическим комитетом Сеченовского университета (PRC-079 от 06.04.2021). Жировую ткань после выделения помещали в среду ДМЕМ («ПанЭко», Россия), содержащую 1 мг/мл цефазолина («Биосинтез», Россия), переносили в чашки Петри, измельчали и добавляли 0,1% раствора коллагеназы I типа («ПанЭко», Россия) в среде ДМЕМ с цефазолином. Измельченную ткань инкубировали 1,5 часа при температуре +37°C, встряхивая каждые 15 минут. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут (1100 об./мин) при 15°C, высевали в чашки Петри и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в ростовой среде ДМЕМ/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Biosera, Франция), 0,584 мг/мл L-глутамина («ПанЭко», Россия), 5000 ед./мл пенициллина («ПанЭко», Россия) и 5000 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия). Трансдукцию клеток проводили в среде ДМЕМ/F12 с антибиотиками и 2% ЭТС в течение 24 часов. Далее клетки культивировали в среде, содержащей ДМЕМ, 10% ЭТС, 0,584 мг/мл L-глутамина, 0,05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 2,16 мг/мл β-глицерофосфата (Sigma, США), 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина, при 37°C и 5% CO₂.

В качестве матриц-носителей для аденовирусных конструкций с геном *BMP2* человека и ибупрофена (Ibu) использовали матрицы на основе полилактидных гранул (PLA-гранул), коллагена I типа (Col, «ИМТЕК», Россия) и фибрина, полученного из PRP крыс. PLA-гранулы были изготовлены из поли-L-лактида с молекулярной массой 200 кДа (4032D, NatureWorks, США) методом распыления раствора в криованну и последующей лиофильной сушкой. Для формирования плотного фибринового сгустка к полученной по ранее описанной методике PRP [13] добавляли тромбин (100 NIH,

PZ Cormau, Польша) в 10% растворе хлорида кальция («Микроген», Россия).

Аденовирусные конструкции в концентрации 1280 TCID₅₀/мл и Ibu в концентрации 1,25 мг/мл по отдельности импрегнировали в пористые PLA-гранулы в течение 1 часа, после чего смешивали с коллагеновым гидрогелем, добавляли PRP и для полимеризации раствор тромбина в хлориде кальция.

Для оценки адгезионных свойств матрицков по окончании культивирования ММСК ЖТ на их поверхности клетки фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида (Panreac, США) в течение 12 часов при температуре +4°C, затем промывали в PBS и дегидратировали при 4°C в батарее водных растворов этанола: 50%, 75%, 80%, 90% и в абсолютном этаноле. После этого образцы высушивали на воздухе и исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с ускоряющим напряжением 15 кВ с использованием микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды).

Для оценки кинетики высвобождения аденовирусных конструкций из матрицков их помещали в пробирки с 2 мл физиологического раствора («ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение 28 суток, отбирая по 100 мкл раствора каждые 3 суток. Аликвоты хранили при температуре –80°C. Затем выделяли вирусную ДНК с помощью набора QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя и оценивали концентрацию вирусной ДНК на спектрофотометре Nano Drop OneC (Thermo Fisher Scientific, США) при 260 нм.

Кинетику высвобождения Ibu из матрицков в физиологический раствор определяли по оценке поглощения раствора ибупрофена при 264 нм УФ-спектрофотометрии с использованием спектрофотометра Cary 50 (Varian, США).

Относительную экспрессию гена *BMP2* человека после трансдукции клеток аденовирусными векторами и генов остеогенных маркеров, экспрессирующихся в ММСК ЖТ крыс (*RunX2*, *Spp1* и *Alpl*), оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для этого из клеток выделяли общую РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия), проводили синтез кДНК на матрице РНК с использованием RevertAid (Thermo Scientific, Германия) согласно протоколам производителя. ПЦР-РВ проводили в термоциклере Bio-Rad iQ Cycler (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Евроген», Россия). Уровни экспрессии мРНК анализируемых генов были нормированы на средние значения экспрессии референсных генов Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) и Actin-β (*Actβ*). Нуклеотидные последовательности используемых праймеров приведены в таблице.

Оценку продукции белков остеиндукторов (*BMP-2*, *Alpl*) в супернатанте проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Среду собирали на протяжении всего срока и хранили при температуре –80°C. Затем раствор белка концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon (Merck Millipore, США) и исследовали с использованием наборов Quantikine Elisa kit (R&D Systems, США) и Elisa kit (Cloud-Clone Corp., КНР) согласно инструкциям производителей. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Активность щелочной фосфатазы определяли в клеточных лизатах с помощью набора Quantitative Alkaline Phosphatase ES Characterization Kit (Merck Millipore, США) согласно инструкции производителя.

Для обнаружения минерализации ВКМ ММСК ЖТ клетки, фиксированные охлажденным 70% этанолом, были окрашены 2% водным раствором ализаринового

Таблица | Table

Последовательности праймеров | Primer sequences

| Ген Gene | Последовательность нуклеотидов Nucleotide sequence |
|------------|--|
| Actβ | for GAGATTACTGCCCTGGCTCC rev GCTCAGTAACAGTCCGCCTA |
| Alpl | for TGCCTACTTGTGTGGCGTGA rev CGTGACCTCGTTCCCCTGAG |
| BMP2 | for ACTACCAGAAACGAGTGGGAA rev GCATCTGTTCTCGGAAAACCT |
| Spp1 | for GACGATGACGACGGAGACC rev TGGCAGTGAAGGACTCATCA |
| RunX2 | for ACAACAGAGGGCACAAGTTCTAT rev CTGCACTGAAGAGGCTGTTTG |
| Gapdh | for GCGAGATCCCGCTAACATCA rev CCCTTCCACGATGCCAAAGT |

красного (Sigma-Aldrich, США) pH=4,1 в течение 5 минут. Далее ММСК ЖТ промывали дистиллированной водой от несвязавшегося красителя и получали изображения с помощью световой микроскопии.

Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 12.0 (SYSTAT Software, США). В каждой группе было не менее шести биологических повторов, результаты представлены в виде среднее±стандартное отклонение. Для определения вида распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Для попарного сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна–Уитни. Для множественного сравнения групп применяли дисперсионный анализ One Way ANOVA Holm-Sidak тест. Различия между группами считались статистически значимыми при уровне ниже 5% ($p<0,05$).

Результаты

Показано, что трансдукция ММСК ЖТ Ad-BMP2 приводила к увеличению экспрессии целевого гена в 1042 ± 53 раза по сравнению с контрольными, не трансдуцированными клетками. Продукция белка BMP-2 клетками также существенно увеличивалась и через 14 суток составляла $210,6\pm3,0$ пг/мл. При этом добавление к клеткам Ibu в концентрации 0,125 мг/мл приводило к повышению эффективности трансдукции ММСК ЖТ: относительная экспрессия BMP2 в клетках в этом случае увеличивалась в 1158 ± 23 раза по сравнению с контролем, а продукция белка составляла 261 ± 3 пг/мл (рис. 1).

Через 14 суток после трансдукции ММСК ЖТ Ad-BMP2 без добавления Ibu и с добавлением Ibu наблюдалась эффективная остеогенная дифференцировка клеток (рис. 2). Показано увеличение экспрессии генов

RunX2 и *Spp1* в $5,2\pm1,1$ и $3,4\pm0,1$ раза, соответственно, для Ad-BMP2 и в $7,6\pm0,6$ и $9,1\pm0,3$ раза, соответственно, для Ad-BMP2 + Ibu. Кроме того, в трансдуцированных клетках обнаружено увеличение активности *Alpl* в $2,3\pm0,1$ раза для AdBMP2 и в $2,9\pm0,1$ раза после добавления Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с контролем.

Затем были получены ГАМ, состоящие из PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля на основе PRP (Mat). В качестве депо Ibu и аденовирусных конструкций были выбраны высокопористые PLA-гранулы. Включение Ibu в PLA-гранулы приводило к его быстрому высвобождению: уже через 1 сутки в растворе наблюдалось около 40% Ibu, а к 7-м суткам 90%. При этом смешивание гранул с гидрогелем способствовало более медленному выходу Ibu. Из Mat через 1 сутки высвобождалось около 15% Ibu, а полное высвобождение происходило только через 4 недели (рис. 3 А). Также оценили влияние Ibu в составе матриц на кинетику высвобождения аденовирусных конструкций из Mat. В течение первых 7 суток не было выявлено значимых различий в кинетике высвобождения AdBMP2 из матриц с включением Ibu и без него. Однако через 10 суток наблюдалось увеличение скорости высвобождения аденовирусных частиц из Mat-Ad-BMP2 + Ibu (рис. 3 В).

С помощью СЭМ оценили адгезионные свойства матриц, импрегнированных Ad-BMP2 с добавлением Ibu и без добавления Ibu (рис. 4). Показана высокая цитосовместимость всех исследуемых матриц. Импрегнация аденовирусных конструкций и Ibu не влияла на адгезию клеток к поверхности материалов и их морфологию. Часть ММСК ЖТ распластывалась на поверхности PLA-гранул, а часть клеток находилась в толще гидрогеля, при этом клетки имели характерную для ММСК полигональную форму.

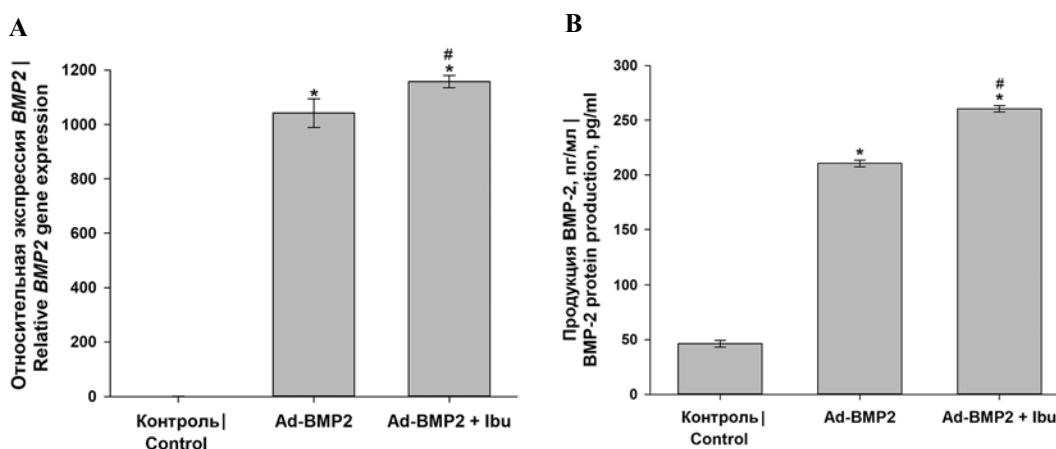


Рис. 1. Влияние Ibu на аденовирусную трансдукцию ММСК ЖТ.

А – относительная экспрессия гена BMP2. ПЦР-РВ. В – продукция белка BMP-2. ИФА

* $p<0,05$ (по сравнению с контролем). # $p<0,05$ (по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu)

Fig. 1. Ibu effect on adenoviral transduction of MSCs.

A – relative expression of the BMP2 gene. Real-time PCR. B – BMP-2 protein production. ELISA

* $p<0.05$ (compared to the control), # $p<0.05$ (compared to transduced cells without Ibu)

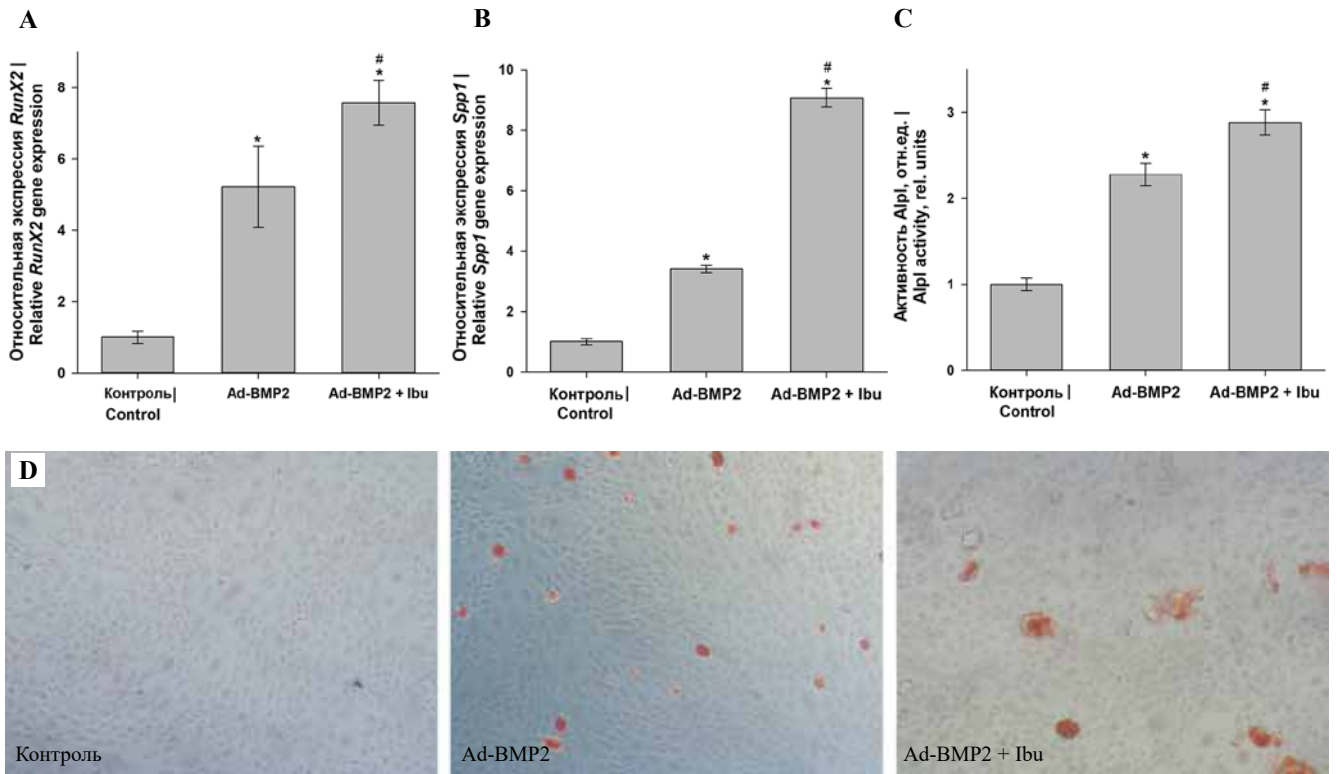


Рис. 2. Влияние Ibu на остеогенную дифференцировку ММСК ЖТ, трансдуцированных Ad-BMP2.

A, B – относительная экспрессия генов остеогенных маркеров. ПЦР-РВ. C – активность щелочной фосфатазы. Спектрофотометрия. D – минерализация ВКМ ММСК ЖТ. Окрашивание ализариновым красным, $\times 10$
* $p < 0,05$ (по сравнению с контролем), # $p < 0,05$ (по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu)

Fig. 2. Ibu effect on osteogenic differentiation of MSCs transduced with Ad-BMP2.

A, B – relative expression of genes of osteogenic markers. Real-time PCR. C – alkaline phosphatase activity. Spectrophotometry. D – ECM mineralization of MSCs. Alizarin red staining, light microscopy, $\times 10$
* $p < 0.05$ (compared to the control), # $p < 0.05$ (compared to transduced cells without Ibu)

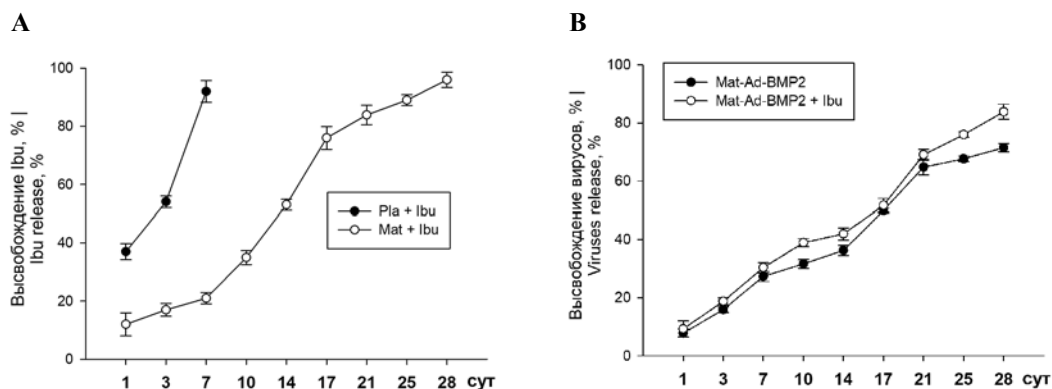


Рис. 3. Кинетика высвобождения Ibu (A) и аденовирусных конструкций (B) из Mat

Fig. 3. Release kinetics of Ibu (A) and adenovirus (B) from Mat

Трансдуцирующую способность аденовирусных конструкций в составе матриц оценивали по экспрессии целевого гена и продукции белка BMP-2 (рис. 5). Показано, что Ad-BMP2, импрегнированные в Mat, высвобождались из матриц и эффективно трансдуцировали ММСК ЖТ. Через 14 суток после инкуба-

ции клеток с ГАМ наблюдалось увеличение экспрессии гена *BMP2*, причем в клетках, культивируемых с Mat-Ad-BMP2 + Ibu, этот показатель был выше, чем для ММСК ЖТ в присутствии Mat-Ad-BMP2 без Ibu: в $13,1 \pm 0,4$ и $14,4 \pm 0,3$ раза, соответственно (рис. 5 A). Кроме того, наблюдалось увеличение продукции белка

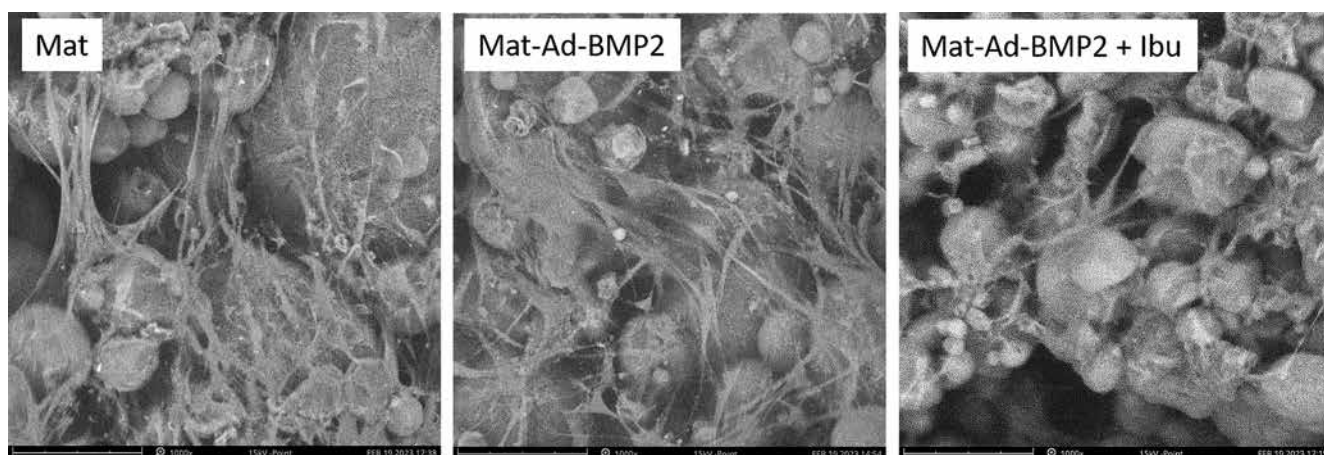


Рис. 4. Аджезия ММСК ЖТ на матрицах через 7 суток. СЭМ, $\times 1000$, масштабный отрезок 80 мкм

Fig. 4. Adhesion of MSCs on matrices after 7 days. SEM, $\times 1000$, scale bar 80 μm

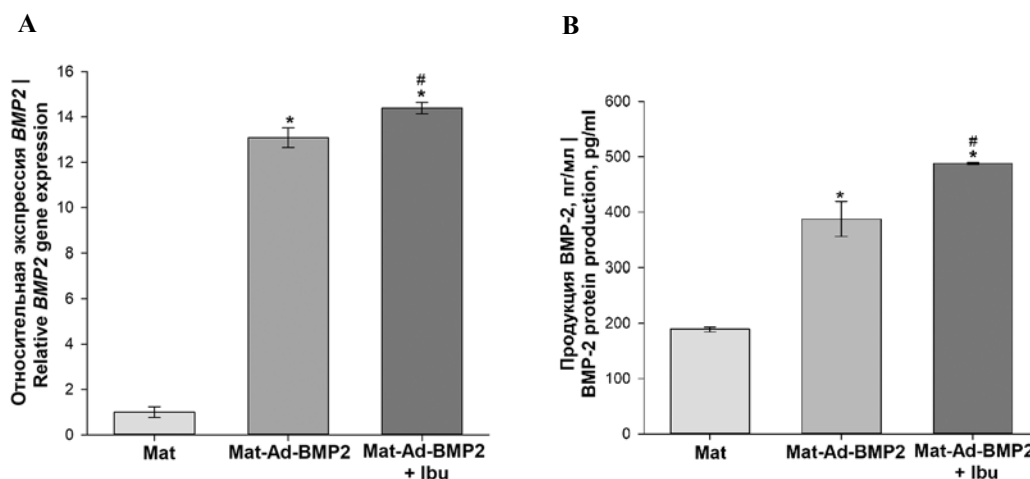


Рис. 5. Трансдуцирующая способность Ad-BMP2, импрегнированных в Mat.

А – относительная экспрессия гена *BMP2*. ПЦР-РВ. В – продукция белка BMP-2. ИФА

* $p < 0,05$ (по сравнению с Mat), # $p < 0,05$ (по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu)

Fig. 5. Transducing ability of Ad-BMP2 impregnated in Mat.

А – relative expression of the *BMP2* gene. Real-time PCR. В – BMP-2 protein production, ELISA

* $p < 0.05$ (compared to Mat), # $p < 0.05$ (compared to Mat-Ad-BMP2 without Ibu)

BMP-2 в культурах ММСК ЖТ при инкубации с Mat-Ad-BMP2 в присутствии Ibu и без него (рис. 5 В). При этом также было обнаружено статистически значимое увеличение продукции BMP-2, продуцируемого клетками, которые культивировали с Mat-AdBMP2 с Ibu ($387,7 \pm 31,5$ пг/мл), по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu ($487,7 \pm 1,9$ пг/мл).

Эффективность остеогенной дифференцировки ММСК ЖТ после инкубации с Mat-Ad-BMP2 с Ibu и без него оценивали по экспрессии гена *Alpl*, продукции и активности соответствующего белка и минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ) (рис. 6). Показано существенное увеличение экспрессии гена *Alpl* в $5,6 \pm 0,8$ и $10,9 \pm 1,0$ раза, соответственно, для клеток в присутствии Mat-Ad-BMP2 и Mat-Ad-BMP2 + Ibu (рис. 6 А). При инкубации ММСК ЖТ с исследуемыми ГАМ наблюдалось увеличение продук-

ции данного белка в $4,6 \pm 0,6$ раза для Mat-Ad-BMP2 и в $5,3 \pm 0,5$ раза для Mat-Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с неактивированными Mat (рис. 6 В). Наряду с этим обнаружено увеличение активности *Alpl* в $3,2 \pm 0,1$ раза в клетках, которые инкубировали с Mat-Ad-BMP2, и в $3,5 \pm 0,2$ раза с Mat-Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с Mat (рис. 6 С). Кроме того, наблюдалась минерализация ВКМ ММСК ЖТ после инкубации клеток с ГАМ (рис. 6 D).

Обсуждение

Аденовирусы хорошо себя зарекомендовали в генной терапии, обладают высокой эффективностью трансдукции различных клеток и одобрены для клинического применения в качестве вакцин [14]. С учетом этого аденовирусные векторы представляют большой интерес при разработке новых ГАМ для регенерации

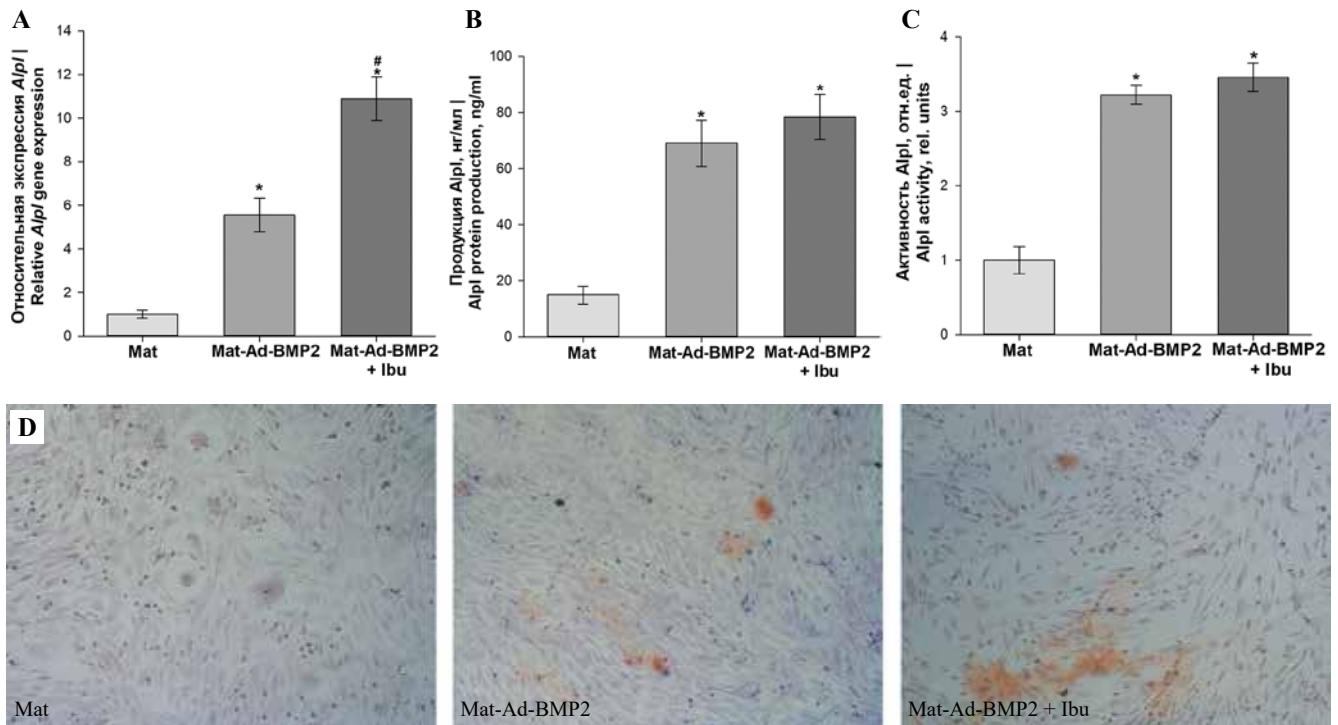


Рис. 6. Остеогенная дифференцировка ММСК ЖТ через 14 суток после инкубации с Mat-Ad-BMP2 с Ibu и без Ibu.

A – относительная экспрессия *Alpl*. ПЦР-РВ. B – продукция *Alpl*. ИФА. C – активность *Alpl*. Спектрофотометрия.

D – минерализация ВКМ ММСК ЖТ. Окрашивание ализариновым красным, световая микроскопия, $\times 10$

* $p < 0,05$ (по сравнению с Mat), # $p < 0,05$ (по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu)

Fig. 6. Osteogenic differentiation of MSCs 14 days after incubation with Mat-Ad-BMP2 with and without Ibu.

A – relative expression of *Alpl* gene. Real-time PCR. B – *Alpl* protein production, ELISA. C – *Alpl* activity. Spectrophotometry.

D – ECM mineralization of MSCs. Alizarin red staining, light microscopy, $\times 10$

* $p < 0.05$ (compared to Mat), # $p < 0.05$ (compared to Mat-Ad-BMP2 without Ibu)

костной ткани. Основным ограничением использования аденовирусных конструкций может быть иммунный ответ организма, особенно при повторном введении вируса. Для решения этой проблемы векторы импрегнировали в биосовместимые матрицы на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля и добавили в состав ГАМ широко используемый НПВП – ибупрофен. Ранее было показано, что инкубация ММСК ЖТ с Ibu приводит к повышению доли клеток, трансдуцированных аденовирусными конструкциями с геном *GFP* [15]. В нашей работе добавление Ibu во время трансдукции клеток Ad-BMP2 способствовало увеличению экспрессии целевого гена и продукции белка.

Влияние НПВП на остеогенные свойства клеток зависит от механизма действия препарата и может как снижать, так и усиливать остеогенную дифференцировку клеток [16, 17]. Однако в литературе нет информации о действии Ibu на дифференцировку клеток при аденовирусной трансдукции. В нашем исследовании обнаружено, что добавление Ibu во время трансдукции ММСК ЖТ способствует более выраженной остеогенной дифференцировке клеток. Несмотря на то, что есть сообщения, что сами НПВП с неселектив-

ным ингибированием ЦОГ снижают активность *Alpl* преостеобластов [18], в данной работе показано, что при трансдукции ММСК ЖТ Ad-BMP2 в присутствии Ibu активность *Alpl* возросла по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu.

Высокие дозы Ibu оказывают цитотоксическое действие на ММСК ЖТ [15]. В связи с этим разрабатываются различные матрицы для пролонгированной доставки Ibu [19, 20], чтобы исключить риск возникновения нежелательных последствий, связанных с высокой дозировкой препарата. Включение Ibu в матрицы на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля позволило нам обеспечить более длительное и постепенное высвобождение НПВП по сравнению с матрицами на основе хитозана и наночастиц гидроксиапатита или хитозана и биоактивного стекла [19].

Аденовирусные конструкции, высвобождающиеся из ГАМ, эффективно трансдуцируют ММСК ЖТ. *In vitro* исследование остеогенных свойств разработанных ГАМ показало, что включение в состав матриц Ibu приводит к значимому увеличению экспрессии гена *Alpl* в ММСК ЖТ по сравнению с клетками, которые инкубировали с Mat-Ad-BMP2 без Ibu, что может быть

связано с положительным влиянием Ибу на эффективность трансдукции клеток. Можно предположить, что в *in vivo* исследованиях матрикса будут способствовать выраженной регенерации костной ткани, а включенный в состав Ибу будет снижать иммунный ответ на вирусные векторы и положительно влиять на трансдукцию Ad-BMP2 клеток-предшественников и их дифференцировку в остеобласты.

Заключение

Таким образом, разработанные ген-активированные матриксы, импрегнированные Ad-BMP2 и Ибу, показали высокую эффективность в экспериментах *in vitro*: они не оказывают токсического действия, поддерживают клеточную адгезию и способствуют остеогенной дифференцировке мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс. Разработанные матриксы обладают высоким потенциалом для клинического применения при лечении пациентов с дефектами костной ткани.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.Б. Бухарова, Д.В. Гольдштейн, С.Н. Чвалун, И.А. Недорубова.
Сбор и обработка материала – В.О. Черномырдина, А.Ю. Меглей, В.П. Басина, В.С. Кузнецова, А.В. Васильев, Т.Е. Григорьев, Ю.Д. Загоскин.
Написание текста – И.А. Недорубова.
Редактирование – Т.Б. Бухарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.B. Bukharova, D.V. Goldshtein, S.N. Chvalun, I.A. Nedorubova.
Collected the data and performed the analysis – V.O. Chernomyrdina, A.Yu. Meglei, V.P. Basina, V.S. Kuznetsova, A.V. Vasilyev, T.E. Grigoriev, Y.D. Zagoskin.
Wrote the paper – I.A. Nedorubova.
Edited the manuscript – T.B. Bukharova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:64–73. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.011.
- Atasoy-Zeybek A, Kose GT. Gene therapy strategies in bone tissue engineering and current clinical applications. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1119:85–101. DOI: 10.1007/5584_2018_253.
- Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 2013;36(1):1–22. PMID: 23435812.
- Ho ML, Chang JK, Chuang LY, Hsu HK, Wang GJ. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(6):983–90. DOI: 10.1016/s0006-2952(99)00186-0.
- Kulesza A, Zielniok K, Hawryluk J, Paczek L, Burdzinska A. Ibuprofen in therapeutic concentrations affects the secretion of human bone marrow mesenchymal stromal cells, but not their proliferative and migratory capacity. *Biomolecules.* 2022;12(2):287. DOI: 10.3390/biom12020287.
- Gabal Y, Ramsey JD. Surface modification of adenovirus vector to improve immunogenicity and tropism. *Methods Mol Biol.* 2021;2183:357–66. DOI: 10.1007/978-1-0716-0795-4_18.
- Бухарова Т.Б., Волков А.В., Воронин А.С., Филимонов К.А., Чаплыгин С.С., Мурушиди М.Ю. и др. Разработка тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека, трансфицированных геном костного морфогенетического белка BMP-2. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013;1(5):45–51. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18912641> (получено 25.04.2024).
Bukharova TB, Volkov AV, Voronin AS, Filimonov KA, Chaplygin SS, Murushidi MYu et al. Development of tissue engineering construction based on multipotent stromal cells of human adipose tissue transfected with the gene of bone morphogenic protein BMP-2. *Clinical and experimental morphology.* 2013;1(5):45–51 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18912641> (accessed 25.04.2024).
- Alonzo M, Primo FA, Kumar SA, Mudloff JA, Dominguez E, Fregoso G et al. Bone tissue engineering techniques, advances and scaffolds for treatment of bone defects. *Curr Opin Biomed Eng.* 2021;17:100248. DOI: 10.1016/j.cobme.2020.100248.
- Чекишева Т.Н. Наноматериалы и их роль в регенерации костной ткани. Клиническая и экспериментальная морфология. 2019;8(4):19–24. DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.19-24.
Chekisheva TN. Nanomaterials and their role in bone tissue regeneration. *Clinical and experimental morphology.* 2019;8(4):19–24 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.19-24.
- da Silva D, Kaduri M, Poley M, Adir O, Krinsky N, Shainsky-Roitman J et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and therapeutic systems. *Chem Eng J.* 2018;340:9–14. DOI: 10.1016/j.cej.2018.01.010.
- Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv Mater.* 2019;31(1):e1801651. DOI: 10.1002/adma.201801651.
- Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets.* 2018;29(6):556–68. DOI: 10.1080/09537104.2018.1430357.
- Bukharova TB, Nedorubova IA, Mokrousova VO, Meglei AY, Basina VP, Nedorubov AA et al. Adenovirus-based gene therapy for bone regeneration: a comparative analysis of *in vivo* and *ex vivo* BMP2 gene delivery. *Cells.* 2023;12(13):1762. DOI: 10.3390/cells12131762.
- Chang J. Adenovirus vectors: excellent tools for vaccine development. *Immune Netw.* 2021;21:e6. DOI: 10.4110/in.2021.21.e6.
- Бухарова Т.Б., Недорубова И.А., Мокроусова В.О., Меглей А.Ю., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В. Влияние ибупрофена на аденовирусную трансдукцию культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Медицинская генетика. 2022;21(12):4–9. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.12.4-9.

- Bukharova TB, Nedorubova IA, Mokrousova VO, Meglei AY, Vasilyev AV, Goldstein DV.* Influence of ibuprofen on adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells. *Medical Genetics.* 2022;21(12):4–9 (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2022.12.4-9.
16. *Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV.* Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *Sci World J.* 2012;2012:606404. DOI: 10.1100/2012/606404.
17. *Hadjicharalambous C, Alexaki VI, Alpantaki K, Chatzinikolaidou M.* Effects of NSAIDs on the osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(11):1403–8. DOI: 10.1111/jphp.12595.
18. *Hadjicharalambous C, Alpantaki K, Chatzinikolaidou M.* Effects of NSAIDs on pre-osteoblast viability and osteogenic differentiation. *Exp Ther Med.* 2021;22(1):740. DOI: 10.3892/etm.2021.10172.
19. *Kumar P, Dehiya BS, Sindhu A.* Ibuprofen-loaded CTS/nHA/nBG scaffolds for the applications of hard tissue engineering. *Iran Biomed J.* 2019;23(3):190–9. DOI: 10.29252/23.3.190.
20. *Zhao L, Chen S, Xie C, Liang Q, Xu D, Chen W et al.* The fabrication of multifunctional sodium alginate scaffold incorporating ibuprofen-loaded modified PLLA microspheres based on cryogenic 3D printing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2022;33(1):1269–88. DOI: 10.1080/09205063.2022.2049059.

Информация об авторах

Ирина Алексеевна Недорубова – научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Виктория Олеговна Черномырдина – младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, младший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Анастасия Юрьевна Меглей – младший научный сотрудник лаборатории цитогенетики Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, младший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Виктория Павловна Басина – лаборант-исследователь лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Валерия Сергеевна Кузнецова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, старший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Андрей Вячеславович Васильев – доктор медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, начальник управления научных и лабораторных исследований Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Тимофей Евгеньевич Григорьев – кандидат физико-математических наук, заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», директор Физтех-школы природоподобных, плазменных и ядерных технологий имени И.В. Курчатова Московского физико-технического института.

Юрий Дмитриевич Загоскин – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Сергей Николаевич Чвалун – доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Дмитрий Вадимович Гольдштейн – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Татьяна Борисовна Бухарова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Author information

Irina A. Nedorubova – Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0001-8472-7116>

Victoria O. Chernomyrdina – Junior Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Junior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0003-3828-8495>

Anastasiia Yu. Meglei – Junior Researcher, Laboratory of Cytogenetics, Research Centre for Medical Genetics; Junior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0003-2970-7176>

Viktoriia P. Basina – Laboratory Research Assistant, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0009-0006-0127-6502>

Valeriya S. Kuznetsova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Senior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0001-8643-1642>

Andrey V. Vasilyev – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Senior Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Head of the Scientific and Laboratory Research Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0002-7169-2724>

Timofei E. Grigoriev – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Deputy Head for Research, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”; Head of the I.V. Kurchatov Phystech School of Nature-like, Plasma and Nuclear Technologies, Moscow Institute of Physics and Technology.
<https://orcid.org/0000-0001-8197-0188>

Yuriy D. Zagoskin – Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”.
<https://orcid.org/0000-0002-5825-8333>

Sergei N. Chvalun – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Corresponding Members of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”.
<https://orcid.org/0000-0001-9405-4509>

Dmitry V. Goldshtein – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>

Tatiana B. Bukharova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>

Патоморфологические изменения в легких морской свинки при моделировании инфекции, вызванной различными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2

*А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, Е.К. Ивлева, Е.В. Спиридонова,
В.В. Омигов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов*

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области, Россия

Резюме. Введение. Основной характеристикой патогенности изучаемого вируса является его способность вызывать гибель чувствительных лабораторных животных. Отсутствие летальных лабораторных моделей для вируса SARS-CoV-2 требует поиска других подходов для оценки патогенности. Изучение инфекционного процесса в тканях легких морских свинок позволяет выявить особенности и закономерности течения заболевания, определить значимые гистологические признаки и основные критерии патогенности. Целью исследования было проведение сравнительного патоморфологического исследования легких морских свинок, инфицированных различными генетическими вариантами SARS-CoV-2, с использованием метода морфометрических стандартизированных критериев.

Материалы и методы. В эксперименте на аутбредных морских свинках (n=96) изучено структурное состояние легких в зависимости от патогенеза COVID-19. Животные в случайном порядке были разделены на семь опытных групп и одну контрольную по шесть самцов и шесть самок в каждой. Опытные группы были интраназально инфицированы штаммами геновариантов Ухань, альфа, бета, гамма, дельта и омикрон (последний представлен двумя генетическими линиями – BA.5.2 и EG.5) вируса SARS-CoV-2, животным контрольной группы вводили 0,9% NaCl. Динамику вирусной нагрузки определяли в назальных смывах по полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и инфекционному титру (на культуре клеток Vero E6). На 15-е сутки выживших животных выводили из эксперимента. Патоморфологическое исследование проводили методом оптической микроскопии гистологических препаратов легких.

Результаты. При гистологическом исследовании тканей легкого морской свинки отмечено сходство патологического процесса у морских свинок и пациентов с COVID-19, проявляющегося в виде диффузного альвеолярного повреждения. Выявлены достоверные различия по ряду патоморфологических признаков, вызванных коронавирусом разных генетических вариантов. Определенный морфометрическим методом максимум патологического действия SARS-CoV-2 на ткани легких был вызван геновариантом гамма. Дистелектазы в легких морских свинок, как достоверно различающийся для всех геновариантов SARS-CoV-2 признак, связанный с избыточной цитокиновой активностью, является, по нашему мнению, основным маркером патогенности штаммов SARS-CoV-2. Альвеолярно-геморрагический синдром характерен для всех изученных вариантов коронавируса, за исключением омикрон EG.5. Генетические линии варианта омикрон оказывают минимальное патологическое действие на ткани легких и не вызывают гибели морских свинок.

Заключение. Морская свинка может применяться в качестве релевантной животной модели COVID-19. Характер патоморфологических изменений легких зависит от геноварианта вируса SARS-CoV-2, вызывающих эти изменения.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, морская свинка, легкие, патоморфология, генетические варианты SARS-CoV-2

Для корреспонденции: Андрей Владимирович Шиповалов. E-mail: shipovalov_av@vector.nsc.ru

Для цитирования: Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Ивлева Е.К., Спиридонова Е.В., Омигов В.В., Пьянков О.В., Таранов О.С. Патоморфологические изменения в легких морской свинки при моделировании инфекции, вызванной различными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2. Клин. эксп. морфология. 2024;13(4):47–57. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.47-57.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 18.04.2024. Получена после рецензирования 24.05.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Pathomorphological changes in lung tissue of guinea pigs in SARS-CoV-2 infection model

A.V. Shipovalov, G.A. Kudrov, E.K. Ivleva, E.V. Spiridonova, V.V. Omigov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk oblast, Russia

Abstract. Introduction. The main characteristic of pathogenicity of SARS-CoV-2 virus is its ability to cause death in sensitive laboratory animals. The absence of lethal animal infection models requires the search for other approaches to assess pathogenicity. Studying infectious processes in guinea pig lungs allows us to identify the features and patterns of the disease, determine significant histological characteristics, and identify the main pathogenic criteria. We aimed to conduct a comparative pathomorphological study of lung tissue in guinea pigs infected with various SARS-CoV-2 variants using morphometric standardized criteria.

Materials and methods. We looked at structural changes in the lungs of 96 outbred guinea pigs depending on COVID-19 pathogenesis. The animals were randomly divided into seven experimental and one control groups of 6 males and 6 females each. The experimental groups were intranasally infected with the following SARS-CoV-2 strains: Wuhan, Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Omicron (the last one represented by two genetic lineages BA.5.2 and EG.5). The control group was intranasally injected with 0.9% NaCl. The viral load over time was determined with RT-PCR on nasal flushes and infection titer (on Vero E6 cell culture). The animals that survived were removed from the experiment on day 15. Pathomorphological examination was performed with optical microscopy of histological lung specimens.

Results. We detected diffuse alveolar damage as a similar pathological feature in the lungs of both patients with COVID-19 and guinea pigs. Significant differences were revealed in the number of pathomorphological signs caused by various genetic variants of COVID-19. The most considerable pathological effect of SARS-CoV-2 on lung tissue was caused by the Gamma variant. We suppose guinea pig lung dystelectasis to be the main marker of pathogenicity of SARS-CoV-2 strains, since this sign differs significantly in SARS-CoV-2 variants and is associated with excessive cytokine activity. Alveolar hemorrhagic syndrome is characteristic of all the studied coronavirus variants except for Omicron EG.5. The genetic lineages of the omicron variant have a minimal pathological effect on lung tissue and do not cause death in guinea pigs.

Conclusion. Guinea pig is an appropriate animal for a SARS-CoV-2 model. Pathomorphological changes in the lungs depend on the SARS-CoV-2 variant causing them.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, guinea pig, lungs, pathomorphology, SARS-CoV-2 variants

Corresponding author: Andrey V. Shipovalov. E-mail: shipovalov_av@mail.ru

For citation: Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Ivleva E.K., Spiridonova E.V., Omigov V.V., Pyankov O.V., Taranov O.S. Pathomorphological changes in lung tissue of guinea pigs in SARS-CoV-2 infection model. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):47–57 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.47-57.

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

Received 18.04.2024. **Received in revised form** 24.05.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

За время пандемии COVID-19 зарегистрировано несколько генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, создающих повышенный риск здоровью населения. Молекулярно-генетические и вирусологические исследования указывают на то, что вновь выявляемые генетические линии характеризуются как более трансмиссивные и одновременно менее патогенные [1]. В связи с этим 5 мая 2023 года Всемирная организация здравоохранения отменила статус пандемии для COVID-19 [2]. При этом заболевание, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, продолжает представлять серьезное испытание для мирового здравоохранения и научного сообщества. Исследования биологических характеристик новых штаммов SARS-CoV-2, направленные на более глубокое понимание патогенеза инфекции для оценки возможных рисков усиления

патогенности, остаются актуальными и критически важными [3].

Необходимое условие получения достоверных прогностических результатов – использование животных моделей. На сегодняшний день разработаны и успешно применены в доклинических испытаниях следующие модели: сирийские хомячки [4], приматы [5], хорьки [6] и трансгенные гуманизированные мыши, экспрессирующие человеческий ангиотензинпревращающий фермент 2 [7], однако летальность и развитие тяжелого заболевания с повреждением легких были показаны только для трансгенных мышей [8]. Тем не менее высокая стоимость и сложность их получения ограничивают широкое использование данной модели.

Сирийские хомячки проявили высокую восприимчивость к инфицированию SARS-CoV-2 и продемонстрировали разнообразный спектр тяжести

заболевания [4, 9]. При этом данная модель имеет свои ограничения, такие как 100% выздоровление к 14-м суткам после инфицирования [10] и специфичный иммунный ответ на S-белок, несхожий с человеческим [11].

Инфекционную патологию при отсутствии летальности у изучаемых животных возможно определить гистологическими методами, анализируя микропрепараты тканей легких. При этом картина патоморфологических изменений имеет значимые различия в зависимости от вида лабораторного животного, геноварианта вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекционный процесс, и инфицирующей дозы. Например, при заражении мышей BALB/c и сирийских хомячков высокими дозами коронавируса в тканях легких наблюдаются проявления альвеолярно-геморрагического синдрома, вызванные прямым цитопатическим действием вируса на альвеолоциты и эндотелий капилляров [12–13], что отмечено у пациентов с COVID-19 [14] и характерно для многих респираторных инфекционных агентов. Подобные поражения легочной ткани грызунов являются основными при исследовании *in vivo* вирулентности высокопатогенного вируса гриппа птиц [15].

С учетом сказанного выше обоснованным становится поиск новой животной модели. Морских свинок довольно часто используют в экспериментах, связанных с исследованием иммунного ответа на различные инфекции. К настоящему времени публикаций, подтверждающих восприимчивость данного вида к SARS-CoV-2, нет, как и публикаций, достоверно опровергающих это.

Цель исследования – проведение сравнительного патоморфологического исследования тканей легких морских свинок, инфицированных различными геновариантами вируса SARS-CoV-2, с использованием метода морфометрических стандартизированных критериев.

Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов и самок аутбредных морских свинок массой 200–250 граммов, полученных из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Морским свинкам подкожно имплантировали транспондеры (чипы) IPTT-300 (BMDS, США) для бесконтактного измерения температуры и идентификации ID и помещали их по две в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 дней до заражения. Во время экспериментов температура в клетках поддерживалась на уровне +22–24°C, относительная влажность 40–55%. Морских свинок взвешивали, измеряли температуру и оценивали на клинические признаки болезни ежедневно. Все эксперименты на животных одобрены биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол БЭК № 3 от 15.06.2021) и проводились в соответствии с соответствующими национальными (ГОСТ 33215-2014.

Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами) и международными [16–19] руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных. Для моделирования инфекционного процесса использовали семь штаммов, относящихся к основным геновариантам вируса SARS-CoV-2: линия Ухань (EPI_ISL_406844), альфа (EPI_ISL_6565012), бета (EPI_ISL_6492245), гамма (EPI_ISL_6565014), дельта (EPI_ISL_7338789), омикрон BA.5.2 (EPI_ISL_16613436) и омикрон EG.5 (EPI_ISL_18520144). Морские свинки были разделены на восемь групп по 12 животных (шесть самцов и шесть самок). Перед заражением их анестезировали – внутримышечно вводили золетил 100 (Virbac, Франция) в дозе 20 мг/кг. Заражение животных проводили интраназально инокуляцией вируса в объеме 100 мкл, в дозе 4 lg ТЦД₅₀. Животным контрольной группы вводили 100 мкл 0,9% раствора NaCl. Начиная со вторых суток после заражения получали смывы из полости носа. Инфекционный титр вируса определяли по 50% тканевой цитопатической дозе вируса для культуры клеток почки зеленой марьютки Vero E6. Параметром контроля вирусной нагрузки в пробах считали пороговое значение Ct в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Суммарные антитела к SARS-CoV-2 в сыворотке крови морских свинок определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Через 15 суток после заражения у выживших животных брали кровь и выводили их из эксперимента, вводя сверхдозу (200 мг/кг) золетила 100 с последующим обескровливанием. Легкие фиксировали в 10% растворе забуференного формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия). После фиксации доли каждого легкого (верхушечная, сердечная, диафрагмальная и добавочная – для правого и верхушечная, сердечная, диафрагмальная – для левого) были изолированы и проведены через гистологический вакуумный инфльтрационный процессор замкнутого типа Tissue-Tek VIP 6 (Sakura, Япония). Срезы, полученные на автоматическом ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином, затем покрывали покровной пленкой в автоматическом стейнере Tissue Tek Film (Sakura, Япония). Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Германия). Оценку распространенности и степени выраженности патологических проявлений инфекции проводили при анализе сканов срезов, полученных на цифровом сканере микропрепаратов Olympus SlideView VS200 (Olympus, Германия; программный пакет

VS200ASW 3.2) с увеличением объектива $\times 20$. При гистологическом исследовании тканей легких животных, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, применяли метод стандартизированных критериев, учитывающий следующие патоморфологические признаки: воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок, перибронхиальная и периваскулярная воспалительная инфильтрация, кровоизлияния в просвет альвеол и бронхов, наличие фибрина в альвеолярном пространстве, выраженность отека, в том числе межальвеолярных перегородок, расширение и полнокровие сосудов. Степень распространенности основных патоморфологических проявлений – воспалительной инфильтрации и альвеолярно-геморрагического синдрома – оценивали по 5-балльной шкале: 1 балл – площадь патологических изменений на срезе занимает до 10% общей площади среза; 2 балла – от 10 до 25% площади среза; 3 балла – от 25 до 50% площади среза; 4 балла – от 50 до 75% площади среза; 5 баллов – площадь патологических изменений более 75% общей площади среза. Остальные признаки инфекции (периваскулярная и перибронхиальная инфильтрация, альвеолярный и периваскулярный отек, полнокровие сосудов) оценивали по 3-балльной шкале, где 1 балл – слабая, 2 балла – умеренная, 3 балла – выраженная. Для количественных переменных (площади патологических изменений ткани легкого) были рассчитаны базовые статистические показатели. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Парное сравнение независимых выборок проведено с применением U-критерия Манна–Уитни, для взаимосвязанных выборок использован тест Вилкоксона. При сравнении показателей в более чем двух независимых группах использован тест Краскела–Уоллеса с тестом множественных сравнений Данна. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. В качестве контроля сравнения использовали легкие интактных морских свинок, содержащихся в тех же условиях, что и животные опытных групп.

Результаты

Независимо от геноварианта вируса у всех животных со второй недели отмечались клинические признаки заболевания в виде отказа от еды и воды, стремительного снижения веса. Начало гибели животных было зарегистрировано с десятых суток после инфицирования. Смертность в группах Ухань, альфа, бета, гамма и дельта варьировала от 25 до 75% без значимых межгрупповых различий.

В тканях органов-мишеней не была подтверждена репликация инфекционно активного вируса, однако РНК вируса SARS-CoV-2 обнаруживалась до пятих суток после инфицирования в смывах полости носа. У всех выживших после заражения животных были выявлены IgG к антигену SARS-CoV-2.

На аутопсии у всех животных отмечена характерная картина для острого повреждения легких: резкое уве-

личение объема, плотная, «резиновая», консистенция, висцеральная плевро лаковая, темно-красного цвета. Выявлено большое количество обтурирующих тромбов в основном стволе, легочных артериях и их ветвях, что указывает на развитие ДВС-синдрома.

При гистологическом исследовании легких обнаружены патологические изменения, характерные для диффузного альвеолярного повреждения, – внутриальвеолярный отек. Наблюдалась инфильтрация межальвеолярных перегородок лимфоцитами и нейтрофилами (рис. 1 А). Встречались фокусы гиперплазии бронхиального и альвеолярного эпителия, что трактовалось нами как маркер репаративного процесса. Наряду с гиперплазией альвеолярного эпителия наблюдали его десквамацию (рис. 1 В). В легких морских свинок, инфицированных геновариантами Ухань, гамма и дельта, по ходу крупных и мелких бронхов, включая терминальные респираторные бронхиолы, наблюдали обильную воспалительную инфильтрацию. В отдельных бронхах выявили деструкцию стенки. На срезе бронхиол наблюдалась воспалительная инфильтрация (рис. 1 С). В отдельных сосудах, преимущественно венозного отдела, обнаружена периваскулярная инфильтрация, но без видимого повреждения стенки (рис. 1 D).

Появление многоядерных клеток в очагах инфильтрации респираторного отдела легких, как и изменение формы и размеров альвеолярного эпителия свидетельствуют о цитопатическом воздействии вируса SARS-CoV-2 (рис. 1 Е). Просветы альвеол были заполнены отечной жидкостью, в которой выявлялись макрофаги и нейтрофилы в качестве маркеров воспалительной реакции (рис. 1 F). Кровоизлияния с практически полным заполнением просвета альвеол эритроцитами встречались довольно часто. Регистрировались массы эритроцитов в просвете кровеносных сосудов, также отмечены полнокровие и тромбоз мелких сосудов.

Штамм геноварианта альфа (рис. 2 А) и референс-штамм Ухань (не приведен на рисунке) вызывали у животных сходные повреждения легких, проявляющиеся в основном в виде дистелектазов и инфильтрации межальвеолярных перегородок. Геновариант бета (рис. 2 В) по сравнению с другими VOC вариантами, исключая омикрон, вызывал менее выраженные патологические повреждения легких, дистелектазы имели очаговый характер и значительно меньшую площадь. В легких животных, инфицированных геновариантом гамма, площадь поражения и количество оцениваемых патологических изменений были максимальными (рис. 2 С). Среди основных патоморфологических признаков выделялись дистелектазы и полиморфная воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок и стенок сосудов. Геновариант дельта вызывал схожую патологическую картину (рис. 2 D), при этом проявление признаков было менее интенсивным. Патоморфологические признаки, регистрируемые в легких лабораторных животных, инокулированных

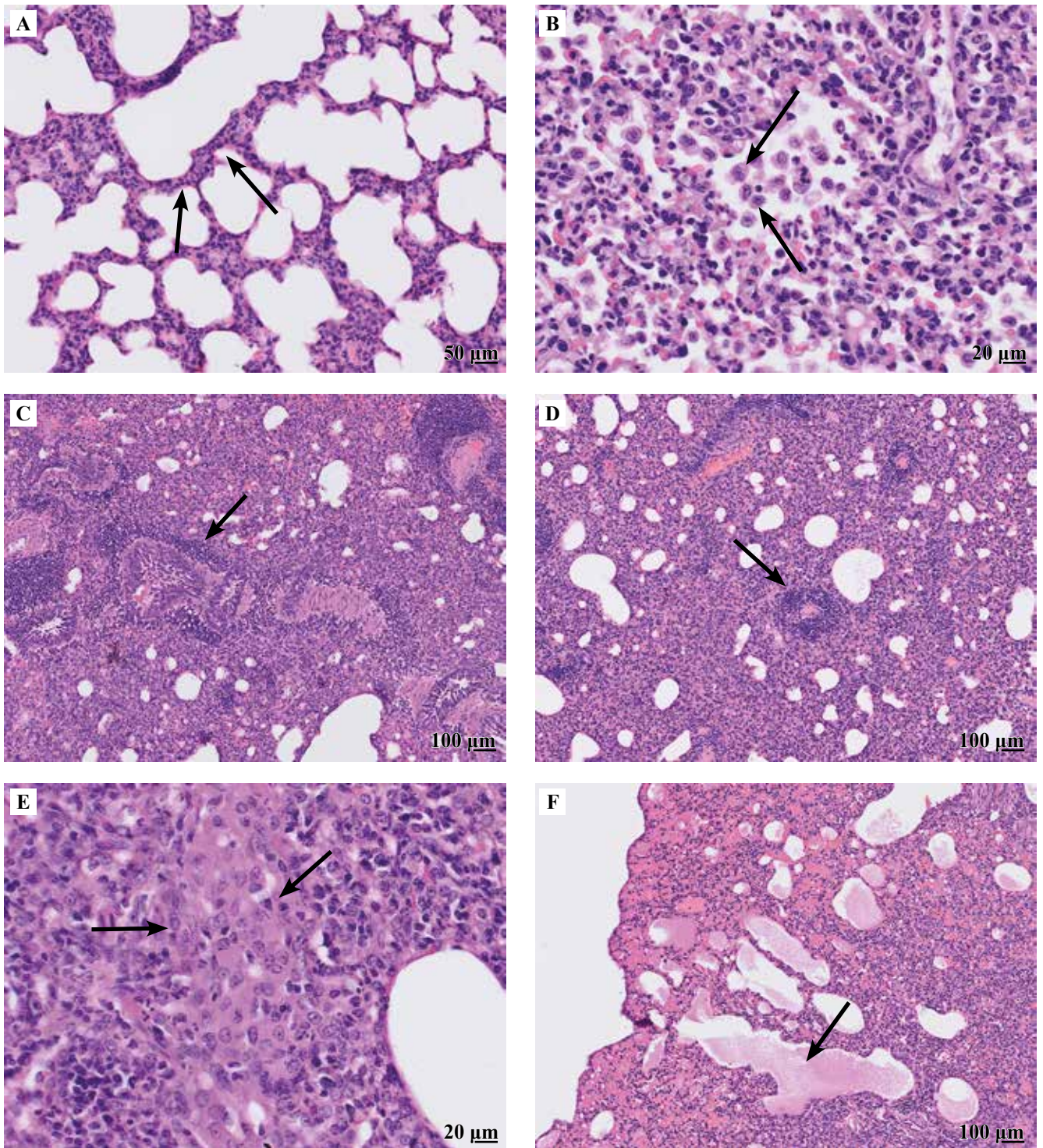


Рис. 1. Гистологический срез легкого морских свинок, инфицированных вирусом SARS-CoV-2.

А – лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок. В – слущенные эпителиоциты в просвете альвеол. С – перибронхиальная инфильтрация. D – периваскулярная инфильтрация. E – изменение пневмоцитов (увеличение размеров, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения, образование синцитиев) как проявление цитопатического эффекта. F – отечная жидкость в просвете альвеол. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях

Fig. 1. Histological section of a guinea pig lung infected with SARS-CoV-2.

A – lymphocytic infiltration of interalveolar septa. B – exfoliated epithelial cells in the alveolar lumen. C – peribronchial infiltration. D – perivascular infiltration. E – changes of alveolar cells (increased size and nuclear-cytoplasmic ratio; syncytia formation) as manifestation of the cytopathic effect. F – edematous fluid in the alveolar lumen. H&E stain. Scale bar is displayed on the micrographs

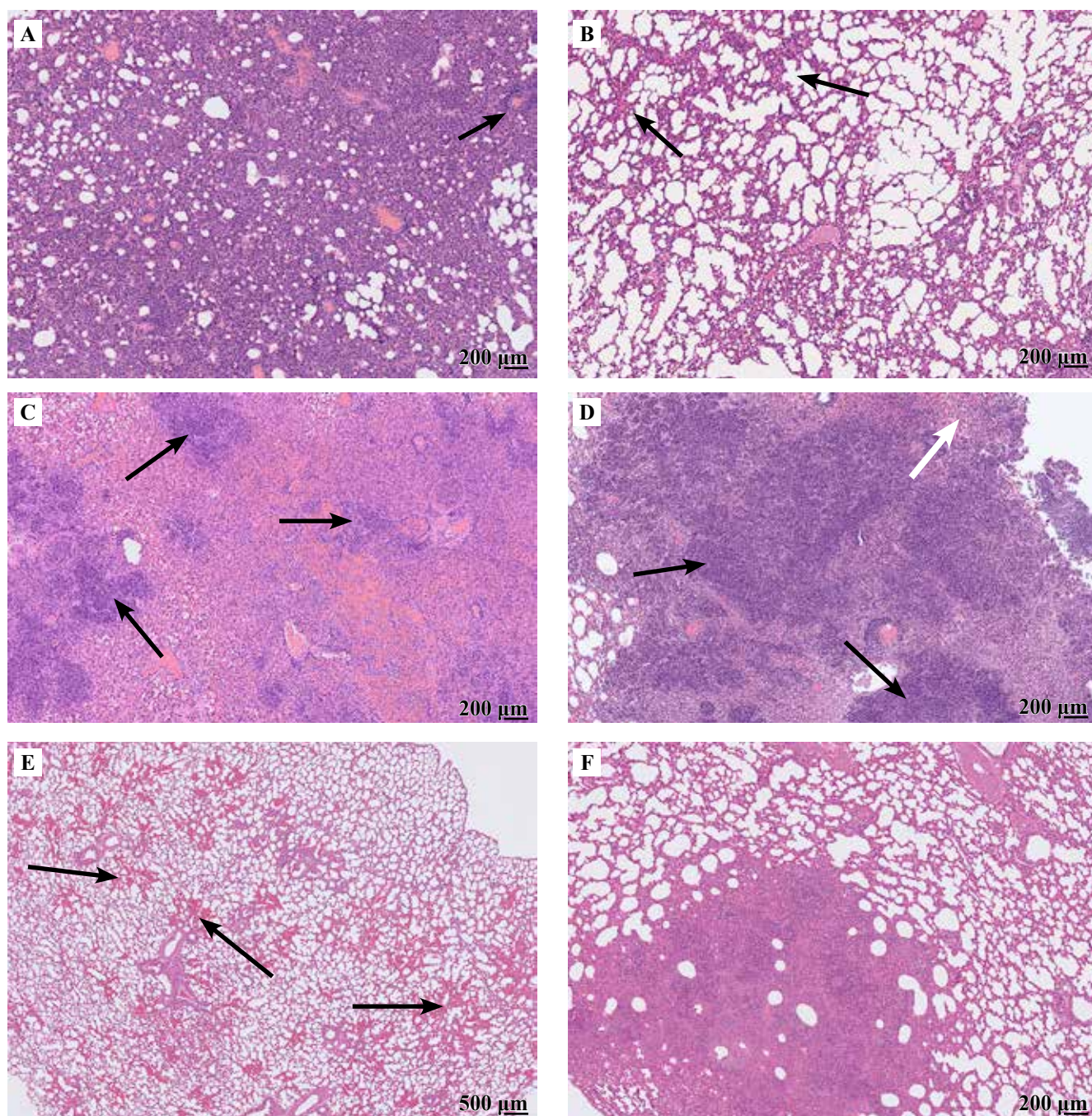


Рис. 2. Гистологический срез легкого морских свинок, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 разных генетических вариантов в дозе 30 ID50.

А – альфа. Выраженная воспалительная нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок со снижением воздушности паренхимы, периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация преимущественно мелких сосудов. В – бета. Слабая воспалительная лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок с сохранением воздушности паренхимы. С – гамма. Обширное кровоизлияние с фокусами некроза легкого. D – дельта. Обширные зоны некроза на фоне альвеолярной геморрагии. E – омикрон BA.5.2. Диффузные мелкие геморрагии. F – омикрон EG.5. Крупный фокус инфильтрации межальвеолярных перегородок с полной потерей воздушности в данной зоне. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях

Fig. 2. Histological section of a guinea pig lung infected with various genetic variants of SARS-CoV-2 at a dose of 30 ID50. A – Alpha. Pronounced inflammatory infiltration of interalveolar septa with decreased airiness of the parenchyma, perivascular lymphocytic infiltration of mainly small vessels. B – Beta. Weak inflammatory infiltration of interalveolar septa and maintenance of the airiness of the parenchyma. C – Gamma. Extensive hemorrhage with foci of lung necrosis. D – Delta. Extensive necrotic zones on the background of alveolar hemorrhage. E – Omicron BA.5.2. Diffuse small hemorrhages. F – Omicron EG.5. A major focus of infiltration of the interalveolar septa with a complete loss of airiness in this area. H&E stain. Scale bar is displayed on the micrographs

штаммами генетических линий варианта омикрон (рис. 2 E, F), обладали меньшей степенью выраженности по сравнению с таковыми при остальных геновариантах. При гистологическом исследовании выявлялся небольшой внутриальвеолярный отек, инфильтрация стенок альвеол, отмечены явления плазмо- и геморагии, выраженные признаки уплотнения легких отсутствовали. Однако вирус SARS-CoV-2 генетической линии омикрон EG.5 (рис. 2 F) не вызывал геморрагических проявлений, выявляемых при инфицировании морских свинок штаммом другой генетической линии – омикрон BA.5.2, что может свидетельствовать о постепенной аттенуации коронавируса в связи с адаптацией к человеческой популяции.

Для выявления достоверных различий между патоморфологическими изменениями тканей легких в группах морских свинок, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 различных генетических линий, был проведен статистический анализ с учетом балла выраженности патологии (рис. 3).

Выраженность геморрагического синдрома значимо не различалась между группами, во всех группах медиана не превысила 1 балл. Исключением является группа омикрон EG.5, достоверно отличающаяся от групп Ухань ($p=0,0075$), бета ($p=0,0013$), гамма ($p<0,0001$), дельта ($p<0,0001$), омикрон BA.5.2 ($p=0,0274$).

Степень выраженности дистелектаза была значимо выше у животных, инфицированных вариантами Ухань, альфа и гамма, со значением медианы в 3 балла. Меньшая степень выраженности патологии показана в группах бета и дельта, минимальная – у генетических линий варианта омикрон. Признак в группе Ухань достоверно отличен от такового в группах бета ($p=0,0002$), дельта ($p<0,0001$), омикрон EG.5 ($p<0,0001$) и омикрон BA.5.2 ($p<0,0001$). В группе альфа данная патология более выражена, чем в группах бета ($p=0,0008$), дельта ($p=0,0002$), омикрон EG.5 ($p<0,0001$) и омикрон BA.5.2 ($p<0,0001$). Группа гамма имеет достоверные различия с группами омикрон EG.5 ($p=0,0250$) и омикрон BA.5.2 ($p=0,0036$).

Воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок проявлялась достоверно более выраженно у животных группы Ухань, альфа и гамма (медиана – 3 балла), менее выражено – в группах бета и дельта (2 балла). Значения данного признака достоверно отличались между группами варианта омикрон и группами Ухань ($p<0,0001$), альфа ($p<0,0001$), гамма ($p=0,0002$ для BA.5.2 и $0,0013$ для EG.5). В группах Ухань и альфа этот показатель значимо отличался от таковых в группе бета ($p=0,0025$ и $0,0363$, соответственно), а значения в группе Ухань от группы дельта ($p=0,0049$).

Достоверное различие между значениями воспалительной инфильтрации стенки бронхов регистрировали в препаратах групп Ухань ($p<0,0001$), гамма ($p=0,0056$ для BA.5.2 и $p=0,0068$ для EG.5) и дельта ($p=0,0022$ для BA.5.2 и $p=0,0029$ для EG.5) по сравнению с группами варианта омикрон.

Воспалительная инфильтрация стенок сосудов в группах Ухань ($p<0,0001$) и гамма ($p=0,0103$ для BA.5.2 и $p=0,0002$ для EG.5) достоверно отличалась от таковой в группах варианта омикрон.

Такой патологический признак как полнокровие альвеолярных капилляров достоверно чаще встречался в препаратах группы Ухань по сравнению с группами гамма ($p=0,0169$) и омикрон ($p<0,0001$ для BA.5.2 и $p=0,0020$ для EG.5). В группе бета этот признак встречался чаще, чем в группе омикрон BA.5.2 ($p=0,0165$).

Обсуждение

В данной работе было показано, что интраназальное инфицирование морских свинок (*Cavia porcellus*) генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2 Ухань, альфа, бета, гамма, дельта и омикрон (последний представлен двумя генетическими линиями – BA.5.2 и EG.5) приводит к клиническому заболеванию, проявляющемуся со второй недели после заражения.

У инфицированных животных выявлены патологические изменения в тканях легких, соответствующие вирусной пневмонии. Степень тяжести выявленных патоморфологических изменений достоверно различалась между некоторыми вариантами SARS-CoV-2. В большинстве случаев повреждение легких послужило причиной гибели животных.

Показано, что основным патоморфологическим проявлением в легких морских свинок является диффузное альвеолярное повреждение в сочетании с альвеолярно-геморрагическим синдромом, что полностью соответствует гистологическим изменениям, наблюдаемым у пациентов, умерших от COVID-19 [20]. В результате нашего исследования также были выявлены характерные для коронавирусной инфекции [14] дисциркуляторные расстройства кровообращения в виде венозного полнокровия в мелких сосудах легких.

Известно, что поверхностные белки вируса SARS-CoV-2 могут воздействовать на Т-лимфоциты, вызывать цитокиновый шторм и серию иммунных ответов в организме [21]. Развитие интерстициального воспаления за счет активации цитокиновой системы приводит к утолщению и отеку межальвеолярных перегородок, снижая воздушность легких [22]. Следует отметить, что подобное влияние вирусиндуцированного воспаления на тяжесть инфекционного процесса характерно и для вируса гриппа, хотя и в меньшей степени [23–24].

На гистологических препаратах легких морских свинок наблюдали ярко выраженное уплотнение паренхимы легкого (дистелектаз). Данный патоморфологический признак, достоверно различающийся для всех геновариантов SARS-CoV-2, связан со способностью разных генетических вариантов коронавируса вызывать гипериммунные воспалительные реакции и, по нашему мнению, может служить критерием оценки тяжести заболевания.

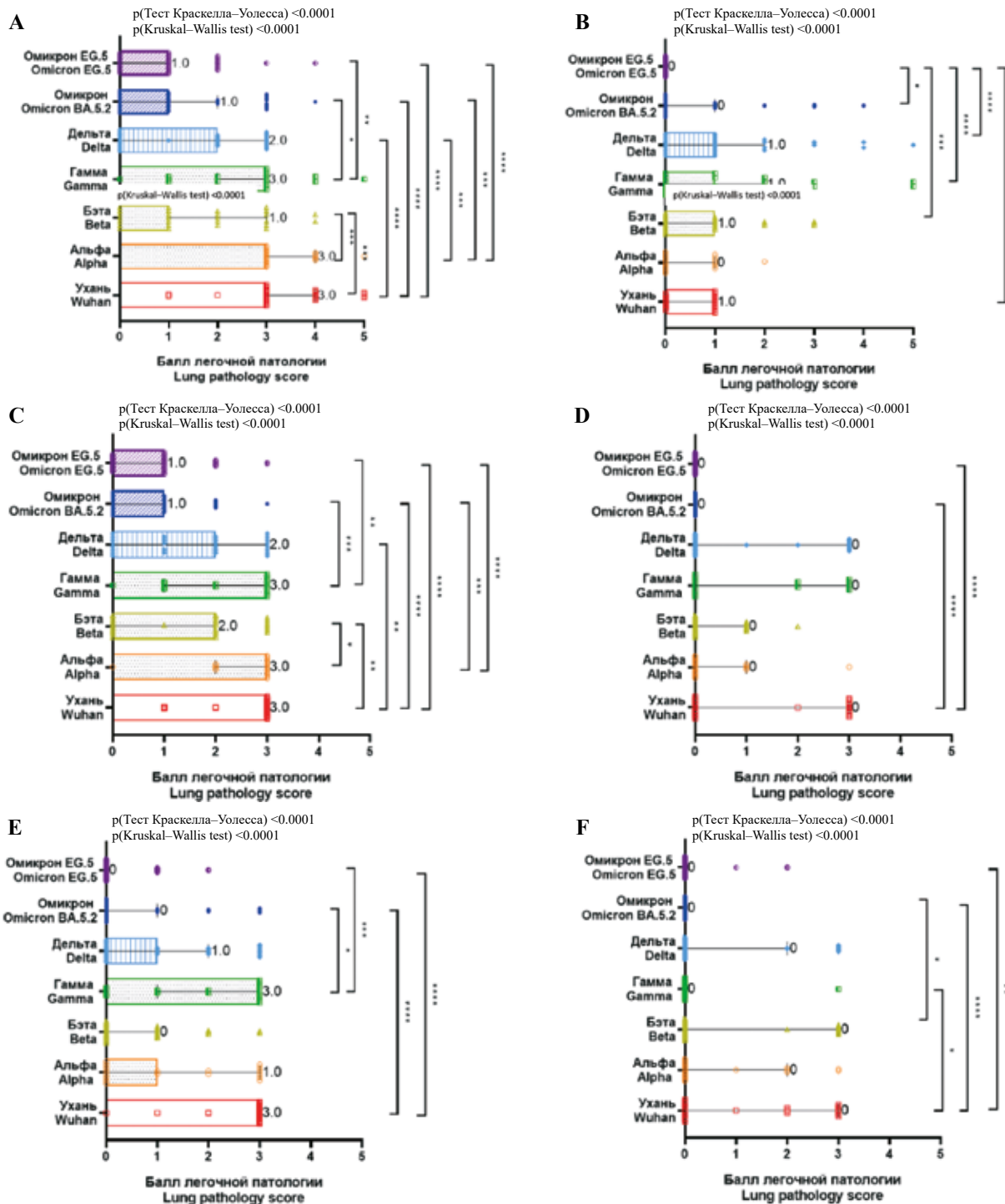


Рис. 3. Частота развития постинфекционной легочной патологии при экспериментальном инфицировании морской свинки геновариантами SARS-CoV-2 в дозе 30 ID₅₀.

А – дистелектаз. В – геморрагии. С – воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок. D – воспалительная инфильтрация стенок бронхов. E – воспалительная инфильтрация стенок сосудов. F – полнокровие альвеолярных капилляров. На диаграмме: точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – медианы, горизонтальные линии – 95% доверительные интервалы.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

Fig. 3. Frequency of post-infection pulmonary pathology in experimental inoculation of guinea pigs with SARS-CoV-2 variants at a dose of 30 ID₅₀.

A – dystelektasis. B – hemorrhages. C – inflammatory infiltration of interalveolar septa. D – inflammatory infiltration of bronchial walls. E – inflammatory infiltration of blood vessel walls. F – dilation and congestion of capillaries in alveolar walls. Legend: individual values (points); medians (tops); 95% confidence intervals (horizontal lines).

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

Описанные патоморфологические изменения легких морских свинок, вызванные вирусом SARS-CoV-2, характерны и для других животных моделей, исследованных нами ранее, – мышей линии BALB/c [12] и сирийских хомячков [13] при низких дозах инфицирования.

Можно констатировать, что применяемый в нашем исследовании для сравнительной оценки степени повреждения легкого как основного органа-мишени метод морфометрических стандартизированных критериев может быть использован как при изучении биологических свойств новых генетических вариантов и линий вируса SARS-CoV-2 на разных видах лабораторных животных, так и для исследований *in vivo* перспективных терапевтических препаратов и вакцин против COVID-19.

Заключение

В работе представлены результаты исследования, показывающие сходство гистологически выявляемых изменений тканей легкого, поврежденного инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у человека и морской свинки, что позволяет использовать выбранное нами модельное животное для изучения COVID-19.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Шиповалов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов.
Сбор и обработка материала – Г.А. Кудров, А.В. Шиповалов, Е.К. Ивлева, Е.В. Спиридонова, В.В. Омигов.
Написание текста – А.В. Шиповалов, Е.К. Ивлева.
Редактирование – А.В. Шиповалов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov.
Collected the data and performed the analysis – G.A. Kudrov, A.V. Shipovalov, E.K. Ivleva, E.V. Spiridonova, V.V. Omigov.
Wrote the paper – A.V. Shipovalov, E.K. Ivleva.
Edited the manuscript – A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA.* Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022;32:e2381. DOI: 10.1002/rmv.2381.
2. World Health Organization (WHO), “Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Overview” (WHO, 2024). Available from: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19> (accessed 01.04.2024).
3. *Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):162–77. DOI: 10.1038/s41579-022-00841-7.
4. *Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(28):16587–95. DOI: 10.1073/pnas.2009799117.
5. *Mukhopadhyay L, Yadav PD, Gupta N, Mohandas S, Patil DY, Shete-Aich A et al.* Comparison of the immunogenicity & protective efficacy of various SARS-CoV-2 vaccine candidates in non-human primates. *Indian J Med Res.* 2021;153(1&2):93–114. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_4431_20.
6. *Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA et al.* SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun.* 2020;11(1):3496. DOI: 10.1038/s41467-020-17367-2.
7. *Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY et al.* A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124–33.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2020.05.020.
8. *Pandey K, Acharya A, Mohan M, Ng CL, Reid SP, Byrareddy SN.* Animal models for SARS-CoV-2 research: a comprehensive literature review. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(4):1868–85. DOI: 10.1111/tbed.13907.
9. *Port JR, Yinda CK, Owusu IO, Holbrook M, Fischer R, Bushmaker T et al.* SARS-CoV-2 disease severity and transmission efficiency is increased for airborne compared to fomite exposure in Syrian hamsters. *Nat Commun.* 2021;12(1):4985. DOI: 10.1038/s41467-021-25156-8.
10. *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 хомяках *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.
11. *Merkuleva IA, Shcherbakov DN, Borgoyakova MB, Isaeva AA, Nesmeyanova VS, Volkova NV et al.* Are hamsters a suitable model for evaluating the immunogenicity of RBD-based anti-COVID-19 subunit vaccines? *Viruses.* 2022;14(5):1060. DOI: 10.3390/v14051060.
12. *Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др.* Изучение восприимчивости линий мышей к вызывающим обеспокоенность вариантам вируса SARS-CoV-2. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;1:148–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.
Shipovalov AV, Kudrov GA, Tomilov AA, Bodnev SA, Boldyrev ND, Ovchinnikova AS et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2022;1:148–155 (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.
13. *Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др.* Патогенность вызы-

- вающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;3:164–169. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169. Shipovalov AV, Kudrov GA, Tomilov AA, Bodnev SA, Boldyrev ND, Ovchinnikova AS et al. Pathogenicity of the SARS-CoV-2 virus variants of concern for the Syrian golden hamster. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;3:164–169 (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169.
14. 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.
15. Шестопалова Л.В., Прокопьева Е.А., Корчагина К.В., Максимова Д.А., Зайковская А.В., Шкурупи В.А. и др. Ультраструктурные изменения альвеолоцитов и макрофагов легких под влиянием высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2011;9(1):58–65. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15602474> (получено 01.04.2024). Shestopalova LV, Prokopiyeva EA, Korchagina KV, Maksimova DA, Zaikovskaya AV, Shkurupi VA et al. Ultrastructural changes of lung alveolocytes and macrophages by influence of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine. 2011;9(1):58–65 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15602474> (accessed 01.04.2024).
16. National research council of the national academies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th. ed. Washington: National Academies Press, 2011. 220 p. DOI: 10.17226/12910.
17. P Flecknell (ed.). Laboratory animal anaesthesia. 4th. ed Oxford: Academic Press, 2015. 321 p. DOI: 10.1016/C2013-0-13494-0.
18. JG Fox, LC Anderson, G Otto, KR Pritchett-Corning, MT Whary (eds.). Laboratory animal medicine. 3rd. ed. London: Academic Press, 2015. 1746 p.
19. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 121 p. Available from: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf> (accessed 01.04.2024).
20. О.В. Зайратьянц (ред.). Патологическая анатомия COVID-19. Атлас. Москва: НИИ организации здравоохранения и медицинского менеджмента ДЗМ, 2020. 140 с. OV Zairatians (ed.). Pathological anatomy of COVID-19. Atlas. Moscow: State Budgetary Institution “Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department”, 2020. 140 p. (In Russ.).
21. Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20. Somova LM, Kotsyurbiy EA, Drobot EI, Lyapun IN, Shchelkanov MYu. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):11–20 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.
22. Савченко С.В., Грицингер В.А., Тихонов В.В., Ламанов А.Н., Новоселов В.П., Кошляк Д.А. Клинико-анатомический анализ летальности от COVID-19 при скорострительной смерти и у умерших в лечебно-профилактических учреждениях. Судебно-медицинская экспертиза. 2021;64(3):5–10. DOI: 10.17116/sudmed2021640315. Savchenko SV, Gritsinger VA, Tikhonov VV, Lamanov AN, Novoselov VP, Koshlyak DA. Clinical and anatomical analysis of mortality from COVID-19 in sudden death and in those who died in health care facilities. Sudebno-meditsinskaya ekspertisa = Forensic Medical Expertise. 2021;64(3):5–10 (In Russ.). DOI: 10.17116/sudmed2021640315.
23. Almansa R, Martinez-Orellana P, Rico L, Iglesias V, Ortega A, Vidaña B et al. Pulmonary transcriptomic responses indicate a dual role of inflammation in pneumonia development and viral clearance during 2009 pandemic influenza infection. PeerJ. 2017;5:e3915. DOI: 10.7717/peerj.3915.
24. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. Clin Infect Dis. 2010;50(6):850–9. DOI: 10.1086/650581.

Информация об авторах

Андрей Владимирович Шиповалов – старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Глеб Александрович Кудров – младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Елена Константиновна Ивлева – младший научный сотрудник отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Екатерина Викторовна Спиридонова – стажер-исследователь отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Владимир Вилорьевич Омигов – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Олег Викторович Пьянков – кандидат биологических наук, заведующий отделом «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Олег Святославович Таранов – заведующий отделом микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Author information

Andrey V. Shipovalov – Senior Researcher, Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>

Gleb A. Kudrov – Junior Researcher, Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-8251-7040>

Elena K. Ivleva – Junior Researcher, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-1194-7219>

Ekaterina V. Spiridonova – Trainee Researcher, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0009-0006-8655-6713>

Vladimir V. Omigov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathomorphology Laboratory, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-2028-6099>

Oleg V. Pyankov – Cand. Sci. (Biol.), Head of Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Oleg S. Taranov – Head of Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Сканирующая электронная микроскопия легких крыс при блеомициновом фиброзе

С.В. Буравков^{1,2}, С.А. Гаврилова¹, Е.В. Иванов¹

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Резюме. Введение. Легочный фиброз – одно из тяжелых заболеваний легких, имеющее высокий риск смертности и функциональных нарушений. Блеомициновая модель легочного фиброза грызунов является одной из наиболее распространенных и часто используемых. Комплексные методики исследования депарафинированных тканей позволяют получить ценную информацию о морфологических, микроструктурных и химических изменениях в тканях без проведения отдельных исследований, на уже существующем материале. Целью данного исследования было выявление методом сканирующей электронной микроскопии характерных морфологических изменений в депарафинированных образцах легких на модели легочного фиброза, вызванного интратрахеальным введением блеомицина крысам. **Материалы и методы.** В работе моделировали развитие фиброза легких на крысах-самцах Вистар массой 200–250 граммов путем интратрахеального введения блеомицина. Спустя 28 дней легкие перфузировали 4% раствором нейтрального забуференного формалина через полую вену до остановки сердца, образцы дофиксировали 10% забуференным формалином в течение 36 часов, проводили через спирты и заливали в парафин. Для проведения сканирующей электронной микроскопии толстые, 250 мкм, срезы депарафинировали в ксилоле и спирте, насыщали гексаметилдисилазаном и высушивали на воздухе. После напыления золотом образцы просматривали и фотографировали на настольном электронном микроскопе JSM-7000.

Результаты. При помощи световой микроскопии признаки фиброза были обнаружены во всех исследованных препаратах легких крыс из экспериментальной группы. При этом выявлена очаговость развития фиброза и выделены три типа структурных изменений: 1) незначительные отличия от показателей в контрольной группе, 2) признаки воспаления с начальными явлениями образования коллагена, 3) области с полностью завершенным фиброзом.

Заключение. Применение сканирующей электронной микроскопии толстых срезов значительно расширяет возможности исследования легких при таких патологиях как фиброз, позволяя исследовать ультраструктуру поверхности с высоким разрешением, а также идентифицировать различные включения, вызывающие патологические изменения, обнаруживаемые с помощью метода рентгеновского микроанализа. Такой подход позволяет просто, быстро и недорого подготавливать образцы для сканирующей электронной микроскопии из архивных парафиновых блоков и дает более детальную структурную информацию о развитии фиброза легких.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, блеомициновый фиброз, легкие крыс

Для корреспонденции: Сергей Валентинович Буравков. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

Для цитирования: Буравков С.В., Гаврилова С.А., Иванов Е.В. Сканирующая электронная микроскопия легких крыс при блеомициновом фиброзе. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):58–66. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.4.58-66.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 76-23/110-03-124012400366-3).

Статья поступила 24.05.2024. Получена после рецензирования 14.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Scanning electron microscopy of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

S.V. Buravkov^{1,2}, S.A. Gavrilova¹, E.V. Ivanov¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Pulmonary fibrosis is a serious lung disease with high risks of mortality and functional impairments. The model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rodents is one of the most common

and frequently used models. Complex methods for analyzing dewaxed tissues enable us to obtain valuable information about morphological, microstructural, and chemical changes in tissues using the existing material, i.e., without conducting separate studies. The purpose of this paper was to identify characteristic morphological changes in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, the medication being administered intratracheally, using scanning electron microscopy (SEM) in deparaffinized lung samples.

Materials and methods. The experiment included male Wistar rats weighing 200–250 g, in which pulmonary fibrosis was modeled by intratracheal administration of bleomycin. After 28 days, the lungs were fixed with perfusion of a 4% solution of neutral buffered formalin through the vena cava until cardiac arrest. The samples were further fixed with 10% buffered formalin for 36 hours, plunged into alcohols, and embedded in paraffin. For SEM, thick 250- μ m sections were deparaffinized in xylene and alcohol, saturated with hexamethyldisilazane, and air-dried. After gold sputtering, the samples were viewed and photographed under a JCM-7000 benchtop electron microscope.

Results. Light microscopy revealed signs of fibrosis in the lungs of all experimental rats. The fibrosis was local. We distinguished three types of structural changes: 1) slight structural differences from the control animals, 2) inflammation with initial signs of collagen formation, and 3) areas with complete fibrosis.

Conclusion. The use of SEM in analyzing thick sections significantly expands the possibilities of studying the lungs in such pathologies as fibrosis and allows one to examine high-resolution surface ultrastructures and identify various inclusions that cause pathological changes seen with X-ray microanalysis. This approach is simple, fast, and low-cost to prepare samples for SEM using existing paraffin blocks and provides more detailed structural information about the development of pulmonary fibrosis.

Keywords: scanning electron microscopy, bleomycin fibrosis, rat lungs

Corresponding author: Sergey V. Buravkov. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

For citation: Buravkov S.V., Gavrilova S.A., Ivanov E.V. Scanning electron microscopy of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(4):58–66 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.58-66.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Lomonosov Moscow State University (No. 76-23/110-03-124012400366-3).

Received 24.05.2024. **Received in revised form** 14.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Фиброзирование является основным механизмом развития интерстициальных заболеваний легких, представляющих собой высокие риски смертности и функциональных нарушений. Первичный (идиопатический) легочный фиброз – относительно редкое, но крайне тяжелое заболевание, трудно поддающееся лечению [1, 2]. В последние годы существенно выросла встречаемость вторичного легочного фиброза, который может развиваться в исходе пневмонии, вызванной SARS-CoV2, и сопровождается значительным снижением респираторных функций [3]. Существующие антифибротические препараты ограничены в своих возможностях, а для разработки новых требуется более глубокое понимание механизмов повреждения и фиброирования легких. За последние десятилетия многими исследовательскими учреждениями проведены сотни научных работ, посвященных легочному фиброзу, в которых накоплены архивные гистологические материалы. Комплексные методики исследования депарфинированных тканей позволяют получить ценную информацию о морфологических, микроструктурных и химических изменениях в тканях без проведения отдельных исследований, на уже существующем материале.

Блеомициновая модель легочного фиброза грызунов является одной из наиболее часто используемых

и описанных в литературе. Она характеризуется относительно быстрым образованием фиброзной ткани, сохраняющейся в течение нескольких месяцев на фоне относительно низкой летальности и значимого снижения функции легких [4–6]. Блеомициновая модель выполняется в разных модификациях, с разными путями введения и дозами блеомицина. Поскольку путь введения и значительной степени влияет на повреждающий механизм и область воздействия, важно иметь четкие представления о механизмах повреждения и репарации для каждого из вариантов. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) депарфинированных тканей – удобный и информативный метод исследования, который пока не в должной степени освещен в научной литературе. Для последующего применения метода к архивным материалам требуются исследования, выполненные на контролируемых сериях экспериментов.

Цель исследования – выявить характерные морфологические изменения в модели легочного фиброза, вызванного интратрахеальным введением блеомицина крысам, методом СЭМ в депарфинированных образцах легких.

Материалы и методы

При проведении исследований мы руководствовались положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспери-

ментов или в иных научных целях, а также правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено на заседании биоэтического комитета факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 2 от 09.02.2023).

Самцы крыс Вистар массой 200–250 граммов были получены из питомника конвенционального содержания в Институте медико-биологических проблем РАН. Всего в исследование после периода акклиматизации 2 недели ввели 30 животных (десять – группа контроля, 20 – экспериментальная группа, в которой моделировали легочный фиброз). В течение всего времени крыс содержали в конвенциональном виварии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при 12-часовом цикле освещения со свободным доступом к воде и стандартному комбикорму по три особи в клетке.

При моделировании фиброза блеомицин (Nippon Kaуaku, Япония), разведенный в стерильном физиологическом растворе, вводили интратрахеально крысам, анестезированным изофлураном в дозе 7,5 мг/кг. Методику моделирования фиброза и дозу препарата выбирали согласно данным литературы [6, 7]. За крысами наблюдали в течение 28 дней, после чего при глубокой анестезии вскрывали грудную клетку, сердце и легкие перфузировали 4% раствором нейтрального забуференного формалина через полую вену до остановки сердца. Легкие извлекали из грудной клетки и заполняли таким же раствором формалина для расправления альвеол. Диафрагмальную долю правого легкого иссекали в области видимой патологии, выделяли срез толщиной не более 4 мм, который затем фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 36 часов. Далее образцы легкого отмывали проточной водой, обезвоживали в изопропиловых спиртах восходящей концентрации, минеральном масле и парафине, после чего заливали в парафиновые блоки.

В исследовании применяли методы корреляционной микроскопии для сравнения результатов, полученных при помощи световой микроскопии, с данными СЭМ. Для проведения СЭМ использовали блоки, залитые в парафин, с которых после получения срезов для световой микроскопии и их окрашивания гематоксилином и эозином и по методу Массона получали толстые срезы, 250 микрон. После этого их депарафинировали в ксилоле в течение суток при постоянном щадящем помешивании на шейкере (Shaker S-3, Латвия) при 50 об./мин, проводили через 100° спирт (30 минут) и гексаметилдисилазан (30 минут). Гексаметилдисилазан дает возможность обойтись без сушки при критической точке и высушивать образцы на воздухе без нарушения тонких структур поверхности [8]. Высушенные на воздухе образцы монтировали на столиках для микроскопа с использованием углеродного двустороннего скотча и напыляли золотом.

Анализ и фотографирование проводили на настольном сканирующем электронном микроскопе, оснащенный рентгеновским микроанализатором JСМ-7000 (JEOL, Япония). Цифровые фотографии сохраняли в формате TIFF с разрешением 1.3 МП.

Результаты

По результатам световой микроскопии признаки фиброза были обнаружены в 100% исследованных препаратов легких крыс из экспериментальной группы.

Корреляционная микроскопия очень удобна для сравнения результатов световой и электронной микроскопии. На рисунке 1 А представлен срез, окрашенный гематоксилином и эозином, а на рисунке 1 В – ультраструктура поверхности последующего толстого среза, подготовленного для проведения сканирующей микроскопии. Следует отметить, что при депарафинировании и монтаже срезов на столике для проведения СЭМ стоит обращать внимание на сторону, которая будет обращена наружу, иначе нарушится соответствие световой и электронной картины.

Более детальные изображения различных участков легких, полученные с помощью СЭМ у животных контрольной группы, приведены на рисунке 2. Поверхность серозной оболочки висцеральной плеврой представлена плоским однослойным эпителием из мезотелиальных клеток полигональной формы со множеством микроворсинок, образующих межклеточные соединения (рис. 2 А, В).

На рисунках 2 С и D показана ультраструктура поверхности бронха у животных контрольной группы при разном увеличении. Отчетливо видны складчатость и клеточная структура поверхности, клетки которой покрыты многочисленными микроворсинками. Наличие эритроцитов на поверхности свидетельствует об операционном заборе материала и не является артефактом.

Ультраструктура альвеолярной поверхности легких крыс контрольной группы представлена на рисунках 2 Е и F. При малом увеличении (рис. 1 В) альвеолярная часть легких напоминает пчелиные соты, каждая альвеола выстлана уплощенными клетками альвеолярного эпителия, основную часть которых занимают альвеолоциты 1-го типа, на их долю приходится 90–95% всей поверхности альвеолы. Эти клетки активно участвуют в газообмене и тесно контактируют с легочными кровеносными капиллярами. Альвеолоциты 2-го типа (рис. 2 F) имеют округлую или овальную форму и обладают многочисленными короткими микроворсинками на апикальной поверхности.

Исследование структуры поверхности с помощью СЭМ легких крыс с блеомицининдуцированным фиброзом при малом увеличении отчетливо выявило места пораженных областей. Следует сказать, что поражение легких носило гнездовый характер. В местах, где фиброзный процесс не начался, ультраструктура альвеол (рис. 3 А, В), а также эпителий висцеральной

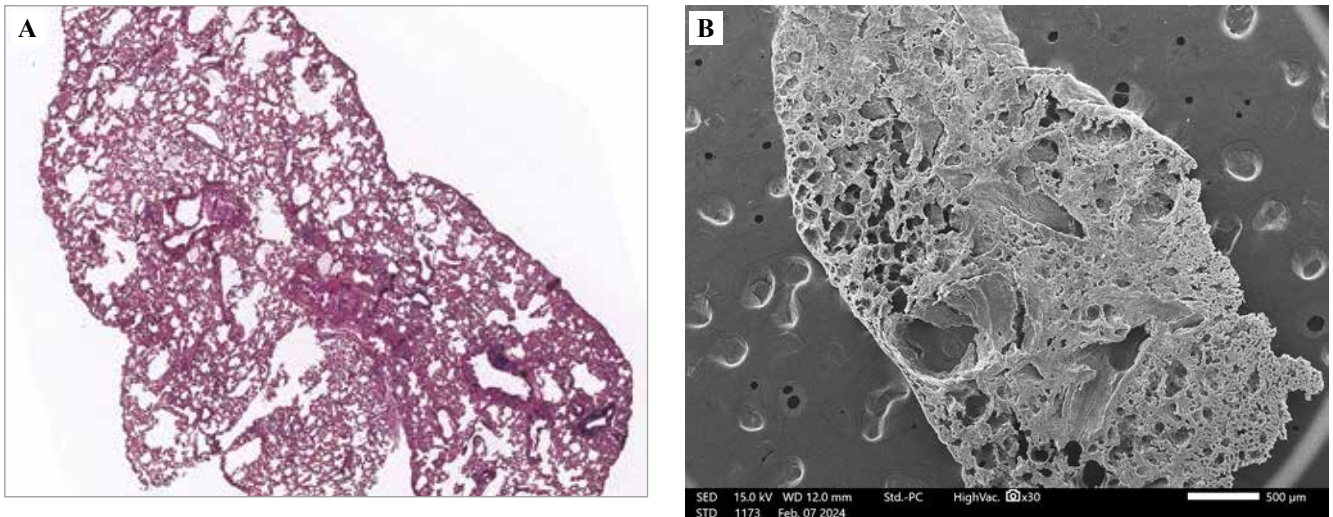


Рис. 1. Малое увеличение срезов легких крыс в контрольной группе животных.

А – 5 мкм срез, окрашенный гематоксилином и эозином. В – 250 мкм срез, подготовленный для проведения СЭМ. Масштабный отрезок соответствует 500 мкм

Fig. 1. Low magnifications of lung sections of rats in the control group of animals.

А – 5-µm section stained with H&E. В – 250-µm section prepared for SEM. The scale bar is 500 µm

плевры (рис. 3 С, D) не отличались от таковых у контрольных животных. Вместе с тем встречались места с резко выраженной воспалительной реакцией с лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 4 А, В) с появлением тонких отдельных волокон коллагена (до 0,1 мкм), еще не сплетающихся в пучки. В областях с полностью завершившимся фиброзом практически отсутствовала клеточная структура, а все пространство было занято волокнами коллагена. Размер волокон, расположенных отдельно, составлял порядка 0,1 мкм, они часто располагались хаотично, однако, сливаясь в жгуты, могли достигать 5 мкм, заполняя все пространство в ткани. В значительной степени поиск локализации мест исследования под электронным сканирующим микроскопом облегчался наличием параллельных гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и трихромом по Массону.

Обсуждение

В исследовании использовался метод корреляционной микроскопии, когда параллельно анализировали срезы 5 мкм в световом микроскопе, окрашенные гематоксилином и эозином или по Массону, а в сканирующем электронном микроскопе – толстые, 250 мкм, срезы после их депарафинирования. Это дает возможность легко идентифицировать как место, так и соответствующие структуры. Очень часто в работах можно встретить корреляционные исследования в конфокальном или флуоресцентном микроскопе с последующей сканирующей электронной микроскопией для получения более детальной морфологической информации о структуре [9]. В случае наличия каких-либо включений, имеющих место при различных профессиональных заболеваниях легких, таких как силикозы, асбестозы

и т.д., они легко могут быть идентифицированы, и их химический состав определен с помощью рентгеновского микроанализа [10, 11].

Исследования легких методом сканирующей электронной микроскопии проводились в Институте морфологии человека еще в 1987 году Л.К. Романовой [12]. Однако тогда не осуществлялось корреляционное исследование со световой микроскопией, а изучались объемные образцы легочной ткани, подготовленные специально для СЭМ.

В своей работе мы показали, что архивный материал, залитый в парафин, возможно использовать для исследований не только в световом, но и в сканирующем электронном микроскопе, что дает возможность более детально увидеть ультраструктуру клеточной поверхности без каких-либо значительных дополнительных затрат.

В наших исследованиях не отмечены изменения мезотелиальных клеток висцеральной плевры при развитии фиброзного процесса при использованной нами модели легочного фиброза. Считается, что основной функцией мезотелиальных клеток является секреция серозной жидкости, а также синтез и транспорт веществ из серозной жидкости в лимфатическое русло. Мезотелиальные клетки висцеральной плевры (МКВП) метаболически активны, поддерживают динамическое состояние гомеостаза в плевральном пространстве. В ответ на повреждение они реагируют пролиферацией и хемотаксисом, покрывая участки оголенного внеклеточного матрикса. Этот ответ опосредуется аутокринной сигнализацией, обусловленной выработкой хемокинов. Юкстакринные и паракринные связи между клетками обеспечивают быструю реакцию во время воспаления [13]. МКВП являются фагоцитар-

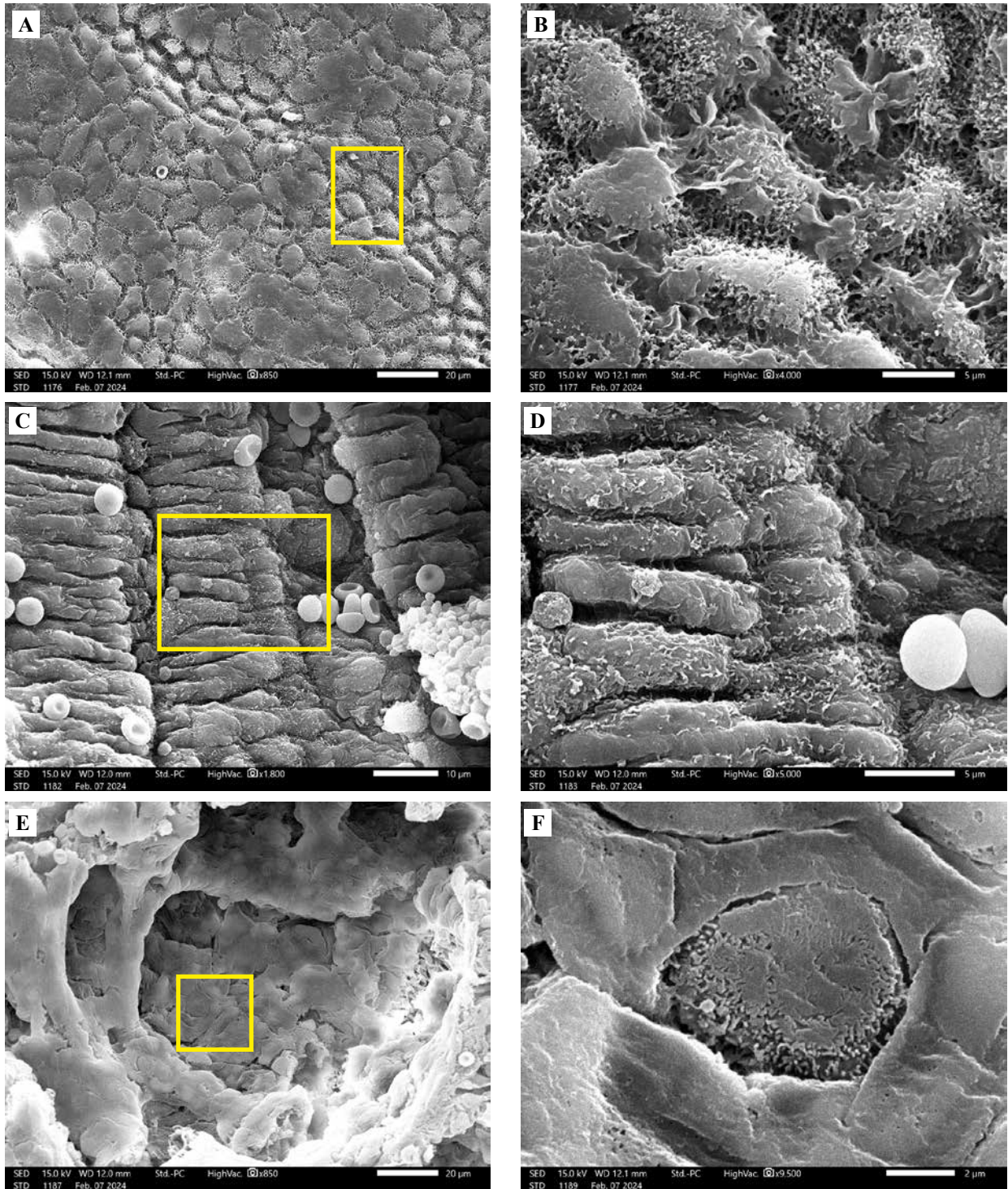


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия ультраструктуры поверхности легких крыс контрольной группы.
 А – легкое в области висцеральной плеуры. Масштабный отрезок 20 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Видны многочисленные микроворсинки и множественные межклеточные контакты. Масштабный отрезок 5 мкм.
 С – ткань легкого в области бронхов. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм.
 E – ультраструктура поверхности альвеолы. Масштабный отрезок 20 мкм. F – тот же участок при большем увеличении. В центре отчетливо виден альвеолоцит 2-го типа. Масштабный отрезок 2 мкм

Fig. 2. SEM of the ultrastructure of the lung surface in the control group of animals.
 A – lung in the area of visceral pleura. The scale bar is 20 μm. B – an enlarged view of the area marked with a square in A. Numerous microvilli and multiple intercellular contacts are visible. The scale bar is 5 μm. C – lung tissue in the area of bronchi. The scale bar is 20 μm. D – an enlarged section of bronchi, marked with a square in C. The scale bar is 5 μm. E – ultrastructure of the alveolar surface. The scale bar is 20 μm. F – enlarged area marked with a square in E. Type 2 alveolar cells are clearly visible in the center. The scale bar is 2 μm

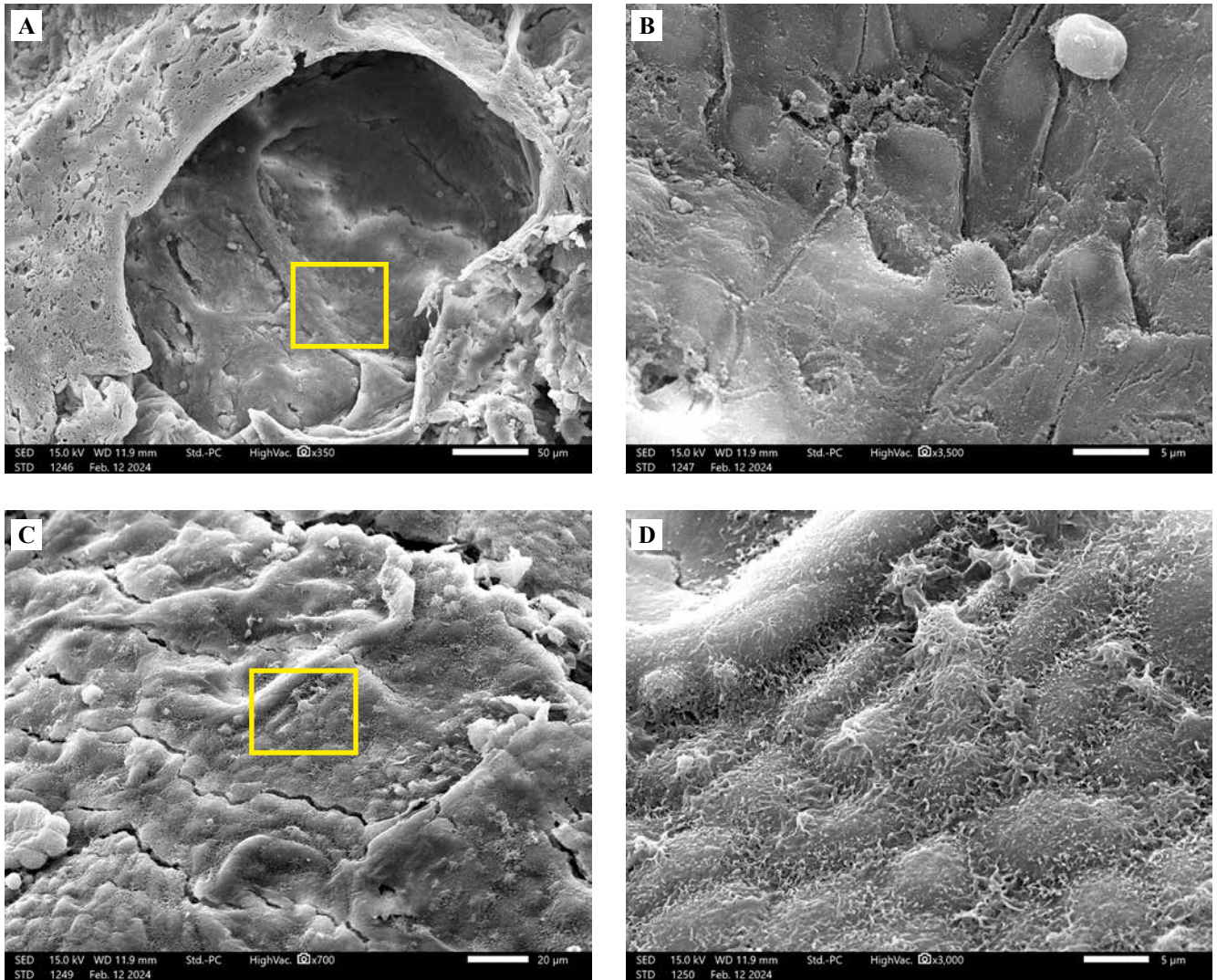


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия ультраструктуры поверхности легких крыс с блеомициновым фиброзом. А – ткань легкого в области альвеол. Масштабный отрезок 50 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм. С – легкое в области висцеральной плевры. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм

Fig. 3. SEM of the ultrastructure of the lung surface with bleomycin-induced fibrosis.

A – lung tissue in the area of alveoli. The scale bar is 50 µm. B – enlarged section of alveoli marked with a square in A. The scale bar is 5 µm. C – lung in the area of the visceral pleura. The scale bar is 20 µm. D – enlarged section of the ultrastructure of the pleural surface marked with a square in C. The scale bar is 5 µm

ными и продуцируют несколько цитокинов и молекул адгезии [14]. Мезотелиальные клетки имеют микроворсинки и множество межклеточных контактов. Размер и форма, а также количество микроворсинок и органелл в МКВП могут отражать ее функциональность. В МКВП экспрессируются белки плотных соединений, которые, как известно, определяют парацеллюлярную проницаемость [15].

Развитие фиброза носило гнездовый характер, вследствие чего изменения альвеол трудно было оценить. В тех местах, где процесс не начался, ультраструктура поверхности альвеолоцитов как 1-го, так и 2-го порядка выглядела неизменной и не отличалась от контрольных образцов. Альвеолоциты 2-го порядка –

это активно секретирующие клетки, формирующие легочный сурфактант. Очень часто поверхность альвеолоцитов покрыта сурфактантом, представляющим собой поверхностно активную жидкую среду. Функция сурфактанта – снижение поверхностного натяжения пленки тканевой жидкости, покрывающей альвеолярный эпителий, что препятствует слипанию стенки при дыхании. Кроме того, легочный сурфактант осуществляет бактерицидную и иммуномодулирующую функции, стимулирует активность альвеолярных макрофагов.

Предложенный нами метод корреляционного анализа можно использовать при исследовании других легочных патологий. В последнее время значительный

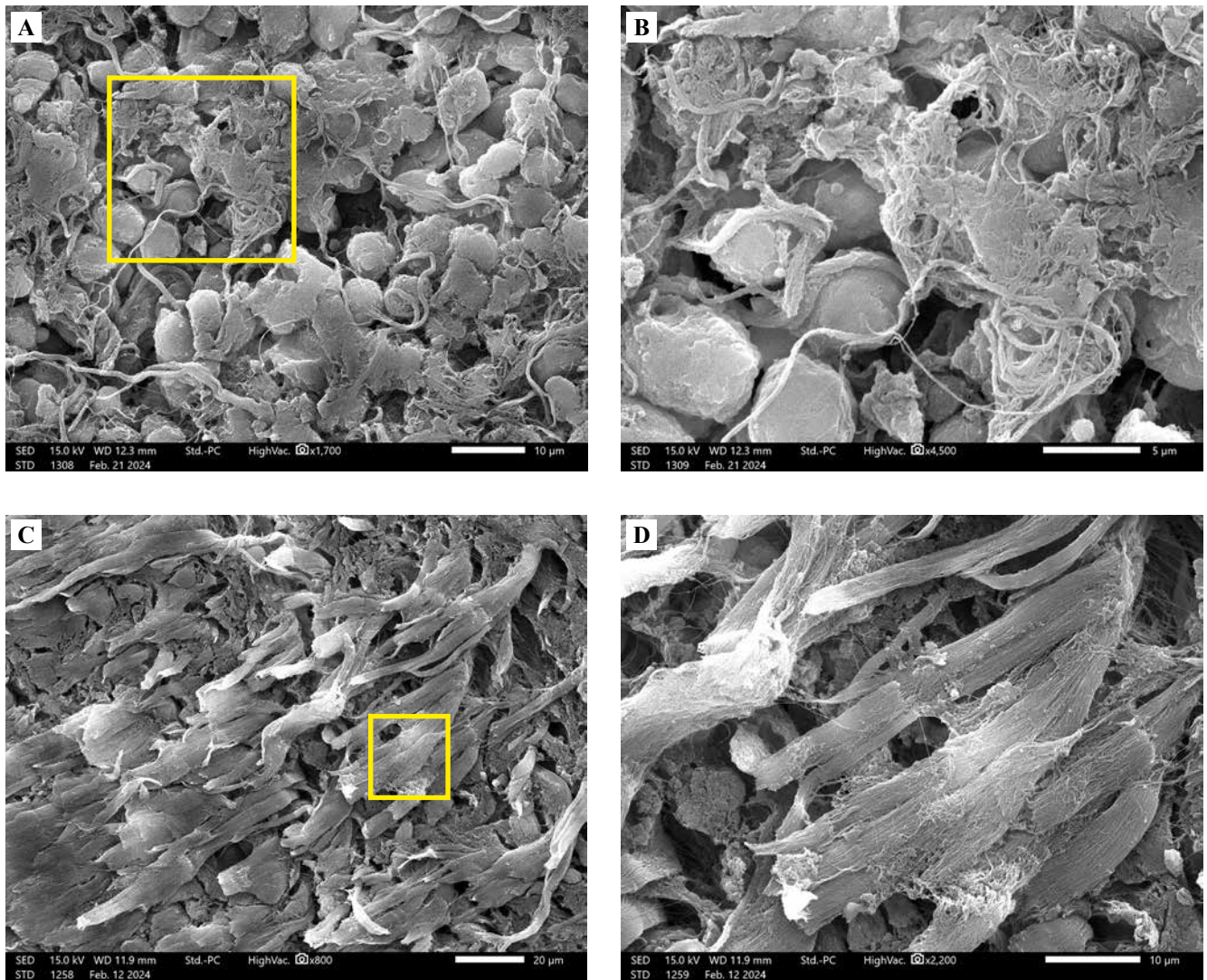


Рис. 4. Очаг воспалительной реакции в легких крыс с блеомициновым фиброзом и завершившимся фиброзом.

А – множественные лимфоциты и коллагеновые пучки. Масштабный отрезок 10 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм. С – участок завершившегося фиброза, отмечаются множественные пучки коллагеновых волокон. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 2 мкм

Fig. 4. The focus of the inflammatory reaction in the lungs of rats with bleomycin-induced fibrosis and complete fibrosis.

A – multiple lymphocytes and collagen bundles. The scale bar is 10 μm. B – enlarged area of inflammation marked with a square in A. The scale bar is 5 μm. C – area of complete fibrosis, multiple bundles of collagen fibers. The scale bar is 20 μm. D – enlarged area marked with a square in C. The scale bar is 2 μm

интерес возник при исследовании методом СЭМ легких пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Так, в работе T. Congiu et al. [16] были обнаружены значительные изменения в ультраструктуре легких, вызванные сужением дыхательных путей. Альвеолярные полости были заполнены фибриллярными структурами, похожими на фибрин. Внутри альвеол часто присутствовали эритроциты, окруженные ретикулярной фибриновой сетью, что указывает на геморрагический альвеолит. Альвеолярные изменения тесно коррелировали с изменениями сосудов, в которых отмечались повреждение эндотелия и тромбоз. Фибриновые микротромбы многократно обнаруживались в ка-

пиллярах межальвеолярной перегородки. Кроме того, нередко выявлялась пролиферация капилляров в альвеолярных перегородках, указывающая на неоангиогенез [17].

Закключение

Применение сканирующей электронной микроскопии существенно расширяет возможности исследования легких при различных патологиях, включая фиброз. Для анализа могут использоваться парафиновые блоки, в том числе архивные, с которых режут толстые, 250-микронные, срезы и депарафинируют их. Параллельные срезы, получаемые для световой

микроскопии, значительно облегчают идентификацию ультраструктур на сканирующей электронной микроскопии. Помимо получения высокого разрешения ультраструктур поверхности становится возможной химическая идентификация различных включений, вызывающих патологические изменения, с помощью метода рентгеновского микроанализа.

Такой подход является простым, быстрым и недорогим способом подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии из архивных парафиновых блоков. Он дает более детальную структурную информацию о развитии фиброза легких.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

Сбор и обработка материала – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

Написание текста – С.В. Буравков, Е.В. Иванов.

Редактирование – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

Collected the data and performed the analysis – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

Wrote the paper – S.V. Buravkov, E.V. Ivanov.

Edited the manuscript – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Wu W, Qiu L, Wu J, Liu X, Zhang G. Efficacy and safety of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2021;11(12):e050004. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-050004.
2. Finnerty JP, Ponnuswamy A, Dutta P, Abdelaziz A, Kamil H. Efficacy of antifibrotic drugs, nintedanib and pirfenidone, in treatment of progressive pulmonary fibrosis in both idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and non-IPF: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2021;21(1):411. DOI: 10.1186/s12890-021-01783-1.
3. Tanni SE, Fabro AT, de Albuquerque A, Ferreira EVM, Verastro CGY, Sawamura MVY et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med*. 2021;15(6):791–803. DOI: 10.1080/17476348.2021.1916472.
4. Kolb P, Upagupta C, Vierhout M, Ayaub E, Bellaye PS, Gaudie J et al. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2020;55(6):1901105. DOI: 10.1183/13993003.01105-2019.
5. Li S, Shi J, Tang H. Animal models of drug-induced pulmonary fibrosis: an overview of molecular mechanisms and characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 2022;38(5):699–723. DOI: 10.1007/s10565-021-09676-z.
6. Danaei N, Kokhdan EP, Sadeghi H, Sadeghi H, Hassanzadeh S, Rostamzadeh D et al. *Stachys pilifera* Benth. Ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through the antioxidant pathways. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:6208102. DOI: 10.1155/2022/6208102.
7. Ren YX, Zhou R, Tang W, Wang WH, Li YC, Yang YF et al. (5R)-5-Hydroxytryptolide (LLDT-8) protects against bleomycin-induced lung fibrosis in mice 1. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(4):518–25. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00524.x.
8. Buravkov SV, Chernikov VP, Buravkova LB. Simple method of specimen preparation for scanning electron microscopy. *Bull Exp Biol Med*. 2011;151(3):378–82. DOI: 10.1007/s10517-011-1335-7.
9. Casares-Arias J, Alonso MA, San Paulo Á, González MU. Correlative confocal and scanning electron microscopy of cultured cells without using dedicated equipment. *STAR Protoc*. 2021;2(3):100727. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100727.
10. Monsó E, Tura JM, Pujadas J, Morell F, Ruiz J, Morera J. Lung dust content in idiopathic pulmonary fibrosis: a study with scanning electron microscopy and energy dispersive x ray analysis. *Br J Ind Med*. 1991;48(5):327–31. DOI: 10.1136/oem.48.5.327.
11. Grosso F, Croce A, Trincheri NF, Mariani N, Libener R, Degiovanni D et al. Asbestos fibres detected by scanning electron microscopy in the gallbladder of patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *J Microsc*. 2017;266(1):48–54. DOI: 10.1111/jmi.12517.
12. Романова Л.К. Органы дыхания. В кн.: О.В. Волкова, В.А. Шахламов, А.А. Миронов (ред.). Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. Москва: Медицина, 1987. С. 288–333.
13. Романова Л.К. Respiratory system. In: OV Volkova, VA Shakh-lamov, AA Mironov (eds.). Atlas of scanning electron microscopy of cells, tissues, and organs. Moscow: Meditsina, 1987. P. 288–333 (In Russ.).
14. Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration*. 2008;75(2):121–33. DOI: 10.1159/000113629.
15. Jonjić N, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P et al. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med*. 1992;176(4):1165–74. DOI: 10.1084/jem.176.4.1165.
16. Markov AG, Amasheh S. Tight junction physiology of pleural mesothelium. *Front Physiol*. 2014;5:221. DOI: 10.3389/fphys.2014.00221.
17. Congiu T, Demontis R, Cau F, Piras M, Fanni D, Gerosa C et al. Scanning electron microscopy of lung disease due to COVID-19 – a case report and a review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(24):7997–8003. DOI: 10.26355/eurrev_202112_27650.
18. Kwon KY, Park KK, Chang ES. Scanning electron microscopic study of capillary change in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Korean Med Sci*. 1991;6(3):234–45. DOI: 10.3346/jkms.1991.6.3.234.

Информация об авторах

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Светлана Анатольевна Гаврилова – доктор биологических наук, доцент кафедры физиологии и патологии, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Евгений Викторович Иванов – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author information

Sergey V. Buravkov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Leading Researcher, Laboratory of Muscle Activity Physiology, Institute of Biomedical Problems.
<https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Svetlana A. Gavrilova – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0000-0002-8776-6062>

Evgenii V. Ivanov – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0000-0002-3382-4458>

Морфология скелетных мышц при динамической физической нагрузке и коррекции L-карнитином

И.А. Хуторская^{1,2}, Г.Ф. Шаймарданова³, В.П. Балашов¹, В.Н. Абрамов¹,
А.В. Балашов¹, Е.В. Быстрова¹, И.А. Евстифеева¹

¹ ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Резюме. Введение. Работы, посвященные исследованию морфологических изменений в скелетной мышечной ткани при динамической физической нагрузке, остаются единичными. Данные о миопротекторных свойствах L-карнитина во многом противоречивы. Цель исследования – анализ ультраструктурных изменений миосимпластов камбаловидной и подошвенной мышц крыс в условиях интенсивной физической нагрузки и действия L-карнитина.

Материалы и методы. Животные (крысы) были разделены на три группы: 1) контрольную – без нагрузки; 2) группу сравнения – с физической нагрузкой; 3) экспериментальную – с физической нагрузкой и получением L-карнитина (100 мг/кг). Физическую нагрузку моделировали ежедневным (21 сутки) принудительным плаванием животных «до предела» с грузом, равным 10% от массы тела.

Результаты. Интенсивная физическая нагрузка приводит к появлению ряда деструктивных изменений в скелетной мышечной ткани обоих типов мышц: внутриклеточного и интерстициального отека, образованию инвагинаций и повреждений кариолеммы, миофибрилл и митохондрий. Профилактическое введение L-карнитина снижает степень выраженности и частоту появления деструкции миосимпластов.

Заключение. Результаты исследования подтверждают наличие протекторных свойств у L-карнитина в отношении скелетных мышечных волокон при интенсивной физической нагрузке.

Ключевые слова: миосимпласт, подошвенная мышца, камбаловидная мышца, динамическая физическая нагрузка, L-карнитин

Для корреспонденции: Ирина Александровна Хуторская. E-mail: alfa200890@yandex.ru

Для цитирования: Хуторская И.А., Шаймарданова Г.Ф., Балашов В.П., Абрамов В.Н., Балашов А.В., Быстрова Е.В., Евстифеева И.А. Морфология скелетных мышц при динамической физической нагрузке и коррекции L-карнитином. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):67–75. DOI: 10.31088/SEM2024.13.4.67-75.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 19.03.2024. Получена после рецензирования 19.04.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Morphology of skeletal muscles under dynamic exercise and correction with L-carnitine

I.A. Khutorskaya^{1,2}, G.F. Shaymardanova³, V.P. Balashov¹, V.N. Abramov¹,
A.V. Balashov¹, E.V. Bystrova¹, I.A. Evstifeeva¹

¹ National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Federal Research Center “Kazan Scientific Center”, Kazan, Russia

Abstract. Introduction. There is paucity of information on morphological changes in skeletal muscle tissue under dynamic exercise. Data on myoprotective properties of L-carnitine are contradictory. The paper aimed to analyze ultrastructural changes in characteristic multinucleated structures of the soleus and plantaris muscles of rats under intense physical activity and the action of L-carnitine.

Materials and methods. The animals were divided into three groups: 1) the control group, in which the rats that did not have physical activity; 2) the comparison group, where the rats had intense physical activity;

and 3) the experimental group, where the rats received L-carnitine at a dose of 100 mg/kg and had intense physical activity. Dynamic exercise was for 21 days running and implied forced swimming “to the limit” with a load equal to 10% of body weight.

Results. An electron microscopic study showed intense dynamic physical activity to lead to a number of destructive changes in the skeletal muscle tissue of both types of muscles: the appearance of intracellular and interstitial edema, the formation of invaginations, and damage to the nuclear membrane, myofibrils, and mitochondria. Preventional injection of L-carnitine reduces the severity and frequency of damage to characteristic multinucleated structures.

Conclusion. The research results indicate that L-carnitine protects skeletal muscle fibers during intense physical activity.

Keywords: characteristic multinucleated structures, plantaris muscle, soleus muscle, dynamic physical activity, L-carnitine

Corresponding author: Irina A. Khutorskaya. E-mail: alfa200890@yandex.ru

For citation: Khutorskaya I.A., Shaymardanova G.F., Balashov V.P., Abramov V.N., Balashov A.V., Bystrova E.V., Evstifeeva I.A. Morphology of skeletal muscles under dynamic exercise and correction with L-carnitine. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):67–75 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.67-75.

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

Received 19.03.2024. **Received in revised form** 19.04.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Тренировочный и соревновательный режим активности профессиональных спортсменов имеют тенденцию к увеличению их интенсивности и нередко осуществляются на уровне предельных возможностей организма. Это может приводить к значительным негативным изменениям в разных функциональных системах и травматизации [1–5]. Для физического перенапряжения типичны изменения метаболизма, отражающие рост специфических маркеров повреждения мышечных волокон, интенсификацию свободнорадикальных процессов с одновременным снижением активности антиоксидантных систем. Данный комплекс нарушений не только является маркером травматизации, но и оказывает негативный эффект на клеточном, тканевом и органном уровнях [6–10]. Препараты метаболического типа действия – структурные аналоги природных биологически активных веществ. Для них характерны низкие показатели токсичности и высокая эффективность в профилактике повреждений органов и тканей в условиях стрессорного и ишемического воздействий. Одним из наиболее перспективных препаратов данной группы является L-карнитин. Он применяется в качестве корректора мышечных нарушений, оказывает антиоксидантное и антигипоксическое действие и обладает широким спектром биологических эффектов [11]. При этом данные о миопротекторных свойствах L-карнитина противоречивы, а механизм его действия по улучшению результатов физических нагрузок не вполне ясен [12]. Несмотря на актуальность представленной проблемы, работы, посвященные изучению ультраструктурных изменений в миосимпласте при динамической физической нагрузке и профилактическом применении препаратов метаболического типа действия, остаются единичными. В отношении L-карнитина методами гистохимического окрашивания было показано, что

препарат уменьшает выраженность гипертрофии мышечных волокон как медленного, так и быстрого фенотипа при динамической физической нагрузке в течение 20 суток [13]. Изучение ультраструктурных изменений могло бы дать больше информации о механизме миопротекторного действия L-карнитина.

Цель исследования – анализ ультраструктурных изменений миосимпластов камбаловидной и подошвенной мышц крыс при моделировании интенсивной физической нагрузки и применении L-карнитина.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись половозрелые крысы обоего пола с массой тела 250–300 граммов. Исследование проводилось на мышцах двух противоположных фенотипов. Камбаловидная мышца млекопитающих образована преимущественно медленными мышечными волокнами [14–16]. Подошвенная мышца содержит главным образом мышечные волокна быстрого типа [17, 18].

Животные случайным образом были разделены на три группы (по шесть крыс): 1) контрольная – крысы со стандартной двигательной активностью для типичных условий вивария; 2) группа сравнения – крысы, подвергшиеся интенсивной физической нагрузке и получившие физиологический раствор в качестве плацебо; 3) экспериментальная – крысы, подвергшиеся интенсивной физической нагрузке и получавшие фармакологическую коррекцию L-карнитином. Внутривенные инъекции L-карнитина (элькар – раствор для парентерального введения 100,0 мг/мл в ампулах по 5,0 мл; «ПИК-ФАРМА», Россия) проводили стерильными шприцами ежедневно однократно за 15–20 минут до начала эксперимента в дозе 100,0 мг/кг, в объеме, не превышающем 1,0 мл.

Динамическую физическую нагрузку моделировали по модифицированной методике В.Х. Василенко,

С.Б. Фельдмана (1989) в виде ежедневного принудительного плавания животных «до предела» в бассейне с грузом, равным 10% от массы тела [19, 20]. Груз прикрепляли к основанию хвоста животного. Продолжительность эксперимента составляла 21 сутки. Температура воды в бассейне поддерживалась на уровне $30 \pm 2^\circ\text{C}$ [1]. Признаком невозможности продолжения плавания являлось отсутствие активных движений у животных с последующим утоплением не менее 10 секунд [21].

По окончании эксперимента у животных под наркозом (тиопентал натрия, 40,0 мг/кг) извлекали камбаловидную (*m. soleus*) и подошвенную (*m. plantaris*) мышцы. Участки мышц для электронномикроскопического исследования фиксировали в 4% нейтральном забуференном параформальдегиде, затем дофиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида и в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере с добавлением сахарозы и заливали в Epon 812 (Fluka, Германия). Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB-III (LKB, Швеция) и контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Образцы изучали с помощью трансмиссионного микроскопа HT 7700 Exalens (Hitachi, Япония).

Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» в виварии. Работа выполнена с соблюдением всех необходимых требований по гуманному обращению с животными в соответствии с решением локального этического комитета Медицинского института Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (протокол № 44 от 18.11.2016).

Результаты

У животных контрольной группы ультраструктура миосимпластов исследуемых мышц является типичной. При исследовании *m. soleus* и *m. plantaris* наблюдали типичное строение компонентов мышечных волокон с незначительными зонами цитоплазматического и интерстициального отека.

Динамическая физическая нагрузка у животных группы сравнения приводила к появлению ряда морфологических изменений в скелетной мышечной ткани. Характер выявленных изменений был однотипен для миосимпластов быстрой и медленной мышц. Изменения были мозаичны, то есть наряду с участками мышечных волокон, которые имеют нормальное строение, наблюдались зоны с нарушениями ультраструктуры. В этих зонах кариолема части ядер образовывала многочисленные инвагинации разной глубины (рис. 1 А). Иногда встречались участки повреждения ядерной оболочки (рис. 1 А). При сравнении с ядрами миосимпластов у животных контрольной группы отмечали меньшую электронную плотность и иногда уменьшение доли пристеночно-

го гетерохроматина, что может свидетельствовать об усилении транскрипционной активности. Отмеченные изменения могут быть также обусловлены развитием внутриядерного отека.

У части мышечных волокон крыс группы сравнения систематически наблюдали локальные зоны отека миосимпласта, которые варьировали по размерам. Такие зоны отека обычно располагались перинуклеарно, а также среди скоплений митохондрий между соседними миофибриллами (рис. 1 А). Сами миофибриллы сохраняли типичное строение. Однако в ряде мышечных волокон отмечались разрывы и разволокнение миофибрилл, вокруг которых, как правило, формировались зоны отека (рис. 1 В). Правильное чередование изотропных и анизотропных дисков также частично утрачивалось, что проявлялось нарушением параллельности соседних миофибрилл (рис. 1 С). Были типичными миофибриллы в состоянии контрактуры.

Энергетический аппарат мышечных волокон тоже подвергался изменениям. Наряду с типичными митохондриями иногда наблюдались органеллы изогнутой или неправильной формы, а также набухшие митохондрии (рис. 1 В). В участках отека они либо были электронноплотными, либо имели электронносветлый матрикс. Митохондрии с электронноплотным матриксом характеризовались плотноупакованными и правильно ориентированными кристами. Наблюдал и набухшие митохондрии с элементами нарушения целостности мембран, для которых был характерен электронносветлый матрикс, что может свидетельствовать об их повышенной функциональной нагрузке [22]. Степень повреждения при этом изменялась от появления небольших участков просветления матрикса до его полной гомогенизации вследствие деструкции крист. Такие органеллы имели вид вакуолей, ограниченных двойной мембраной с остатками крист.

Наряду с описанными изменениями ультраструктуры компонентов цитоплазмы можно отметить появление триад с варьирующим размером Т- и L-трубочек (рис. 1 D). Интенсивная физическая нагрузка не оказывала существенного влияния на скопления между миофибриллами гранул гликогена, рибосом и полисом.

У животных экспериментальной группы, получавших L-карнитин в дозе 100,0 мг/кг перед сеансами принудительного плавания, морфология мышечных волокон преимущественно соответствовала их строению, описанному для животных контрольной группы. Можно отметить, что, как и у животных группы сравнения, наблюдался мозаичный характер изменений ультраструктуры скелетной мышечной ткани в обоих типах мышц. Следует отметить, что зоны миосимпласта с подобными изменениями были значительно меньшими и степень таких изменений была ниже.

Строение большинства ядер миосимпластов соответствовало типичному, но встречались единичные ядра с измененной структурой – наличием инвагинаций

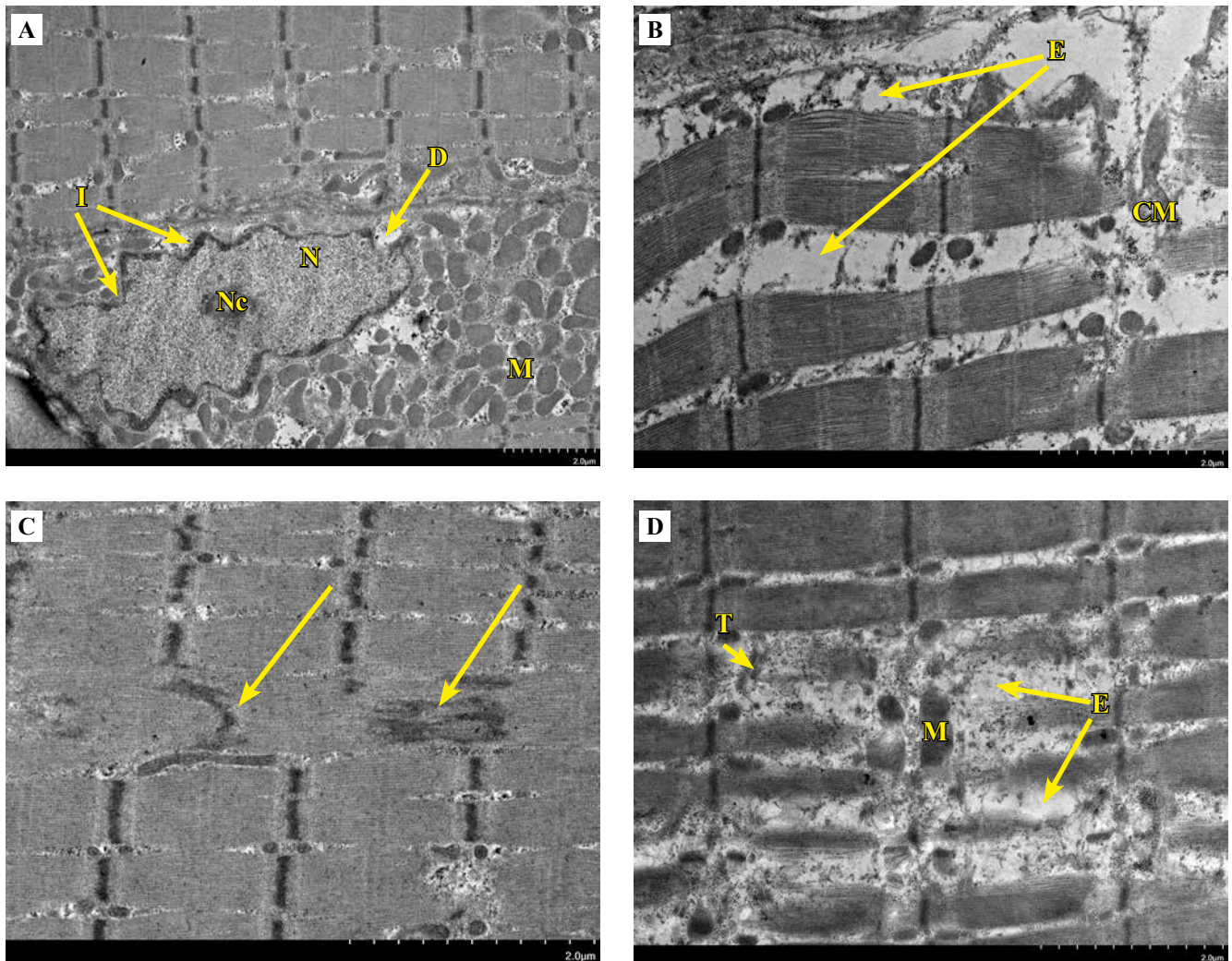


Рис. 1. Ультраструктура камбаловидной (А, С) и подошвенной (В, D) мышц животных группы сравнения. Стрелки (С) – участки с нарушением чередования изотропных и анизотропных дисков. D – участок с разрушением кариолеммы CM – набухшие митохондрии, E – отек, I – инвагинации кариолеммы, M – митохондрии, N – ядро, Nc – ядрышко, T – триада
 Fig. 1. Ultrastructure of the soleus (A, C) and plantaris (B, D) muscles of the animals from the comparison group: areas with disrupted alternation of isotropic and anisotropic discs (arrows on C). D – area with destructed nuclear membrane CM – collapsed mitochondria, E – edema, I – invaginations of the nuclear membrane, M – mitochondria, N – nucleus, Nc – nucleolus, T – triad

и меньшей электронной плотностью. Однако по сравнению с животными группы сравнения выраженность инвагинаций меньше. Участки повреждения кариолеммы отсутствовали (рис. 2 А).

Деструкцию миофибрилл наблюдали редко. В этом случае были видны участки смещения саркомеров или повреждение миофиламентов (рис. 2 В). В сопоставлении с группой сравнения зоны межмиофибриллярного, околядерного и интерстициального отека встречались реже и были значительно меньшими по площади (рис. 2 А–D). Изменения структуры триад и каналцев саркоплазматической сети отмечали реже, чем у животных группы сравнения. Большинство митохондрий имело электронноплотный матрикс с типичной ориентацией крист (рис. 2 А, В). Только единичные органеллы обладали нитевидными кристами и меньшей электронной плотностью (рис. 2 D).

Результаты количественного анализа поврежденных митохондрий представлены на рисунке 3. Как отмечалось ранее, доля митохондрий с элементами деструкции в группе контроля была невелика и не зависела от фенотипа мышечных волокон. Она составила $2,3 \pm 0,55\%$ в камбаловидной мышце и $2,1 \pm 1,22\%$ в подошвенной мышце. У животных группы сравнения интенсивная физическая нагрузка сопровождалась статистически достоверным увеличением доли поврежденных митохондрий до $6,9 \pm 3,00\%$ ($p=0,0016$) и $21,5 \pm 6,93\%$ ($p=0,0001$) в составе камбаловидной мышцы и подошвенной мышцы. Следовательно, под влиянием L-карнитина проявляется заметная тенденция к снижению доли поврежденных митохондрий в составе мышечных волокон камбаловидной мышцы. Для подошвенной мышцы данный показатель статистически достоверно снижается до $5,8 \pm 1,59\%$ ($p=0,0001$).

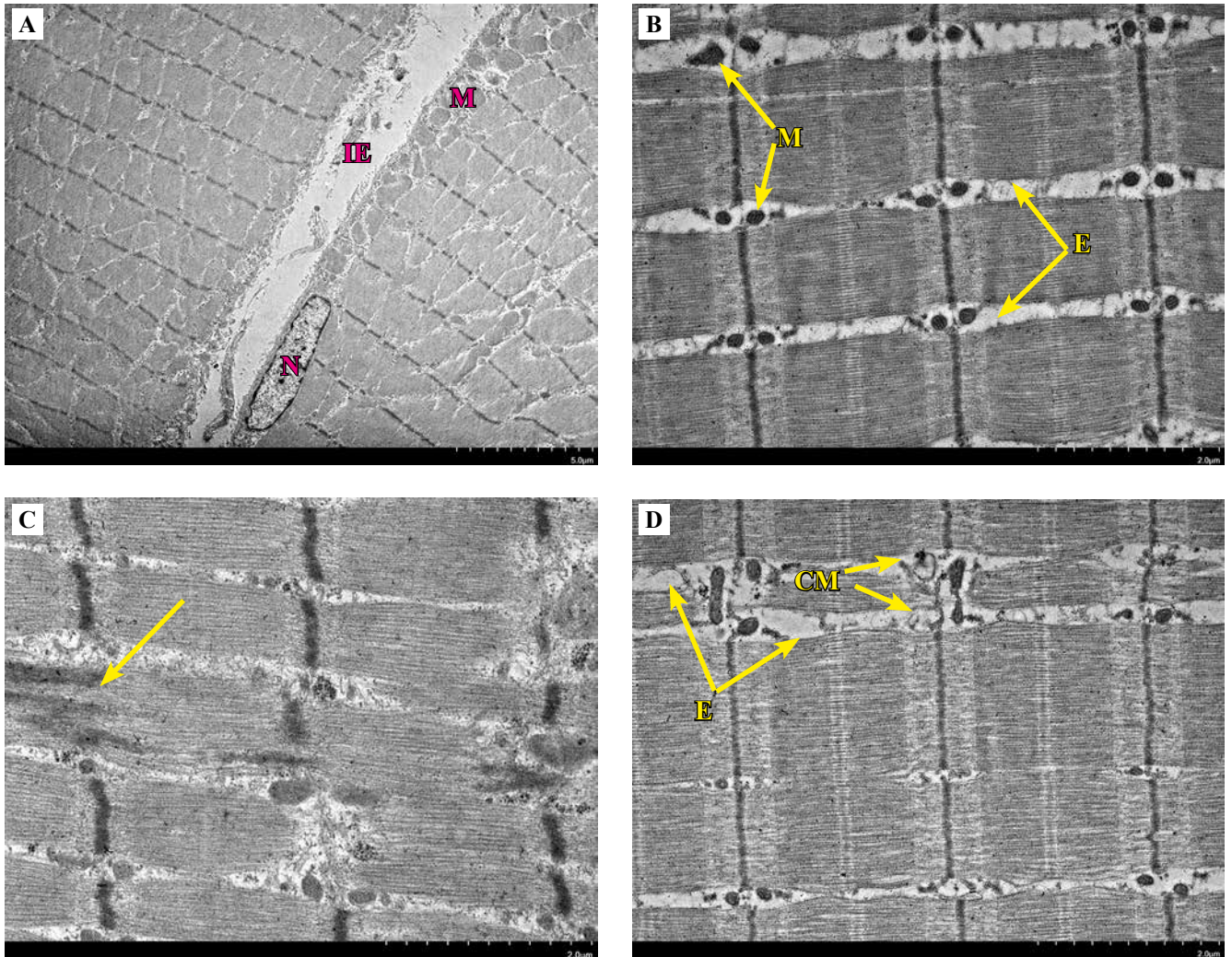


Рис. 2. Ультраструктура камбаловидной (А, С) и подошвенной (В, D) мышц животных экспериментальной группы.

Стрелка (С) – зона с нарушением чередования изотропных и анизотропных дисков

CM – набухшие митохондрии, E – отек, IE – интерстициальный отек, M – митохондрии, N – ядро

Fig. 2. Ultrastructure of the soleus (A, C) and plantaris (B, D) muscles of the animals from the experimental group: zone with disrupted alternation of isotropic and anisotropic discs (arrow on C)

CM – collapsed mitochondria, E – edema, IE – interstitial edema, M – mitochondria, N – nucleus

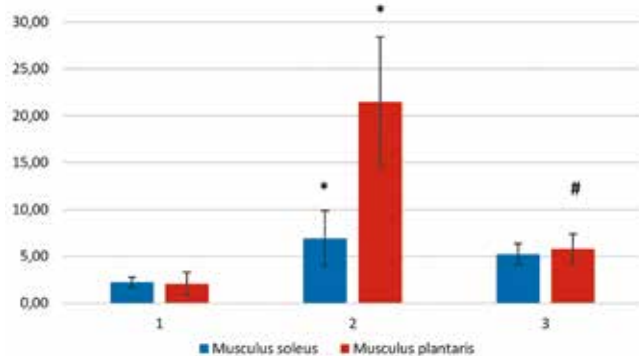


Рис. 3. Доля (в %) поврежденных митохондрий в разных группах: 1 – контрольная; 2 – сравнения; 3 – экспериментальная. Представлены средние значения (M) и среднее квадратичное отклонение (SD) * – различия статистически значимы по отношению к показателю группы контроля, при $p < 0,01667$; # – различия статистически значимы по отношению к показателю группы сравнения, при $p < 0,01667$

Fig. 3. The percentage of damaged mitochondria in all groups: 1 – the control group, 2 – the comparison group, 3 – the experimental group. Mean values (M) and standard deviations (SD) are presented

* – differences are statistically significant in relation to the control group, $p < 0.01667$; # – differences are statistically significant in relation to the comparison group, $p < 0.01667$

Обсуждение

Результаты нашей работы показали негативное влияние длительной интенсивной динамической физической нагрузки на ультраструктуру скелетных мышечных волокон. Следует отметить, что ее повреждающее воздействие наблюдалось как в быстрых, так и в медленных мышцах и имело сходный характер и степень выраженности. В то же время значительная часть отмечаемых нами изменений ультраструктуры миосимпластов мозаична, обратима и, соответственно, некритична для дальнейшего функционирования мышц.

Можно предположить, что описанные изменения ультраструктуры мышечных волокон во многом обусловлены значительным увеличением содержания лактата в саркоплазме на фоне интенсивной физической нагрузки. Наиболее значимым следствием лактацемии является развитие интрасимпластического отека. Кроме того, лактат вызывает ацидоз, который, в свою очередь, интенсифицирует свободнорадикальное окисление липидов [23, 24]. Известно, что свободнорадикальное окисление липидов повреждает мембранные структуры. Этот каскад внутриклеточных процессов, по-видимому, вызывает наблюдавшиеся в нашей работе изменения ультраструктуры мышечных волокон.

Способность L-карнитина уменьшать степень повреждения миосимпластов быстрых и медленных мышц позволяет предположить его компенсаторное влияние на описанные выше процессы. По данным литературы, L-карнитин принимает участие в обеспечении транспорта жирных кислот в митохондриальный матрикс, где реализуется их β -окисление [25]. Он также оказывает антиоксидантное и антигипоксическое действие. L-карнитин ограничивает накопление ацетил-КоА и лактата в крови и мышечной ткани и способствует сохранению целостности мембран [12, 25–27]. Препарат уменьшает окислительный стресс, увеличивая активность антиоксидантных ферментов, а также может предотвратить индукцию апоптоза [28, 29]. Основываясь на данных литературы и полученных нами результатах, можно предположить, что одним из звеньев, обеспечивающих миопротекцию при интенсивных динамических физических нагрузках, является протекторный эффект L-карнитина в отношении структуры и функции митохондрий [25, 26, 30]. Проведенный нами количественный анализ доли поврежденных митохондрий в составе мышечных волокон как быстрой, так и медленной мышц в целом подтверждает предположения о механизме протекторного действия L-карнитина, хотя следует подчеркнуть, что при количественном анализе статистически значимый эффект был нами доказан только для подошвенной мышцы.

Заключение

Интенсивная динамическая физическая нагрузка вызывает ряд негативных изменений ультраструктуры миосимпластов как в быстрых, так и в медленных ске-

летных мышцах. Профилактическое внутрибрюшинное введение L-карнитина крысам в дозе 100,0 мг/кг существенно уменьшает частоту встречаемости и степень выраженности изменений в изученных скелетных мышцах.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.А. Хуторская, В.П. Балашов.

Сбор и обработка материала – И.А. Хуторская, Г.Ф. Шаймарданова, В.Н. Абрамов, Е.В. Быстрова, И.А. Евстифеева.

Написание текста – И.А. Хуторская, Г.Ф. Шаймарданова, В.П. Балашов, В.Н. Абрамов, А.В. Балашов.

Редактирование – И.А. Хуторская, Г.Ф. Шаймарданова, В.П. Балашов, Е.В. Быстрова, И.А. Евстифеева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – I.A. Khutorskaya, V.P. Balashov.

Collected the data and performed the analysis – I.A. Khutorskaya, G.F. Shaymardanova, V.N. Abramov, E.V. Bystrova, I.A. Evstifeeva.

Wrote the paper – I.A. Khutorskaya, G.F. Shaymardanova, V.P. Balashov, V.N. Abramov, A.V. Balashov.

Edited the manuscript – I.A. Khutorskaya, G.F. Shaymardanova, V.P. Balashov, E.V. Bystrova, I.A. Evstifeeva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Мирошников С.В., Нотова С.В., Тимашева А.Б., Маньшина Л.Е.* Показатели адаптивности к физической нагрузке лабораторных животных в условиях экспериментального изменения тиреоидного статуса. *Фундаментальные исследования.* 2012;10:73–77. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18754540> (получено 12.03.2024).
Miroshnikov SV, Notova SV, Timasheva AB, Manshina LE. Indicators of adaptively to physical stress of laboratory animals in experimental changes of thyroid status. *Fundamental Research.* 2012;10:73–77 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18754540> (accessed 12.03.2024).
2. *Воронков А.В., Слиецанс А.А., Муравьева Н.А.* Изучение влияния Антистакса на скорость восстановления работоспособности животных после интенсивной физической нагрузки. *Фармация и фармакология.* 2013;1(1):49–51. DOI: 10.19163/2307-9266-2013-1-1-49-51.
Voronkov AV, Slietsans AA, Muraveva NA. The influence on speed antistax restore functionality animals after intense exercise. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology.* 2013;1(1):49–51 (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2013-1-1-49-51.
3. *Санькова М.В., Николенко В.Н., Вовкогон А.Д., Оганесян М.В., Гридин Л.А.* Дифференцированный подход к профилактике травматизма при занятиях физической культурой и спортом в разные возрастные периоды. *Человек. Спорт. Медицина.* 2021;21(4):185–193. DOI: 10.14529/hsm210421.
Sankova MV, Nikolenko VN, Vovkogon AD, Oganesyans MV, Gridin LA. Differentiated approach to sports injury prevention at

- different age periods. *Human. Sport. Medicine*. 2021;21(4):185–193 (In Russ.). DOI: 10.14529/hsm210421.
4. *Николенко В.Н., Санькова М.В., Хегай А.Д., Оганесян М.В., Ризаева Н.А., Саньков А.В. и др.* Профилактика разрыва ахиллова сухожилия при занятиях физической культурой и спортом: факторы предрасположенности. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2023;13(2):30–38. DOI: 10.47529/2223-2524.2023.2.9.
Nikolenko VN, Sankova MV, Khagai AD, Oganesyanyan MV, Rizaeva NA, Sankov AV et al. Achilles tendon rupture prevention in physical activity and sports: predisposition factors. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika = Sports medicine: research and practice*. 2023;13(2):30–38 (In Russ.) DOI: 10.47529/2223-2524.2023.2.9.
 5. *Булякова Н.В., Азарова В.С.* Аллопластика области травмы в скелетной мышце крысы мышечной тканью от погибшей крысы-донора, предварительно облученной He-Ne лазером. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018;3(27):53–62. DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-53-62.
Bulyakova NV, Azarova VS. Muscle allotransplantation in injured rat skeletal muscle with the tissue from dead rat donor pre-irradiated with He-Ne laser. *Clinical and experimental morphology*. 2018;3(27):53–62 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-53-62.
 6. *Санькова М.В., Николенко В.Н.* Маркеры риска и профилактика рецидивов травматизации опорно-двигательного аппарата у лиц молодого возраста во время физкультурно-оздоровительных занятий. В сб.: И.Г. Дядикова, В.А. Дударева (отв. ред.). *Современные подходы к продвижению принципов здорового образа жизни*. Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского государственного медицинского университета, 2022. С. 14–16. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49555913> (получено 12.03.2024).
Sankova MV, Nikolenko VN. Risk markers and prevention of recurrence of musculoskeletal injuries in young people during physical education and recreational activities. V sb.: IG Dyadikova, VA Dudareva (exec. eds.). *Sovremennye podhody k prodvizheniyu principov zdorovogo obraza zhizni*. Rostov-on-Don: Rostov State Medical University Publ., 2022. P. 14–16 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49555913> (accessed 12.03.2024).
 7. *Платонов В.Н.* Теория адаптации и резервы совершенствования системы подготовки спортсменов (часть 2). *Вестник спортивной науки*. 2010;3:3–9. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17096400> (получено 12.03.2024).
Platonov VN. Adaptation theory and reserves for improvement of athletic training system (part 2). *Sports science bulletin*. 2010;3:3–9 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17096400> (accessed 12.03.2024).
 8. *Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N.* Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(6):757–67. DOI: 10.1515/CCLM.2010.179.
 9. *Pal S, Chaki B, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay A.* High-intensity exercise induced oxidative stress and skeletal muscle damage in postpubertal boys and girls: a comparative study. *J Strength Cond Res*. 2018;32(4):1045–52. DOI: 10.1519/JSC.0000000000002167.
 10. *Balashov V, Balykova L, Khutorskaya I, Bystrova E, Shaymardanova G, Ivyanskiy S et al.* Potential for L-carnitine application in sports practice. *Procedia Comput Sci*. 2020;169:821–8. DOI: 10.1016/j.procs.2020.02.157.
 11. *Верткин А.Л.* L-карнитин в медицинской практике: доказанные эффекты. *Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum*. 2012;1:83–86. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21369790> (получено 12.03.2024).
Vertkin AL. L-carnitine in medical practice: proven effects. *Neurology and rheumatology. Supplement to the journal Consilium Medicum*. 2012;1:83–86 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21369790> (accessed 12.03.2024).
 12. *Karlic H, Lohninger A.* Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition*. 2004;20(7-8):709–15. DOI: 10.1016/j.nut.2004.04.003.
 13. *Хуторская И.А., Балаиов В.П., Балькова Л.А., Шаймарданова Г.Ф., Васильева А.Р., Гущина С.В. и др.* Musculus soleus крыс при физической нагрузке и действии L-карнитина и креатинфосфата. *Вестник Мордовского университета*. 2017;27(3):440–451. DOI: 10.15507/0236-2910.027.201703.440-451.
Khutorskaya IA, Balashov VP, Balykova LA, Shaymardanova GF, Vasilyeva AR, Gushchina SV et al. Musculus soleus of rats at physical activity and L-carnitine and creatine phosphate effect. *Vestnik Mordovskogo universiteta = Mordovia University Bulletin*. 2017;27(3):440–451 (In Russ.). DOI: 10.15507/0236-2910.027.201703.440-451.
 14. *Pereyra AS, Lin CT, Sanchez DM, Laskin J, Spangenburg EE, Neuffer PD et al.* Skeletal muscle undergoes fiber type metabolic switch without myosin heavy chain switch in response to defective fatty acid oxidation. *Mol Metab*. 2022;59:101456. DOI: 10.1016/j.molmet.2022.101456.
 15. *Chemello F, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, Lanfranchi G.* Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. *PLoS One*. 2011;6(2):e16807. DOI: 10.1371/journal.pone.0016807.
 16. *Зырянова Т.Ю., Марков А.Г.* Сравнение характеристик мышечных волокон скелетных мышц мышей линии C57BL/6J и нокаутных по гену CD97. *Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Медицина*. 2013;2:201–210. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19410163> (получено 12.03.2024).
Zyryanova TYu, Markov AG. Comparison of the skeletal muscle fiber characteristics of different skeletal muscles in C57BL/6J and CD97-knockout mice. *Vestnik of Saint Petersburg university. Medicine*. 2013;2:201–210 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19410163> (accessed 12.03.2024).
 17. *Vlaic J, Josipovic M, Bohacek I, Jelic M.* The plantaris muscle: too important to be forgotten. A review of evolution, anatomy, clinical implications and biomechanical properties. *J Sports Med Phys Fitness*. 2019;59(5):839–45. DOI: 10.23736/S0022-4707.18.08816-3.
 18. *Roberts MD, Mobley CB, Vann CG, Haun CT, Schoenfeld BJ, Young KC et al.* Synergist ablation-induced hypertrophy occurs more rapidly in the plantaris than soleus muscle in rats due to different molecular mechanisms. *Am J Physiol Regul*

- Integr Comp Physiol. 2020;318(2):R360–8. DOI: 10.1152/ajpregu.00304.2019.
19. *Василенко В.Х., Фельдман С.Б., Хитров Н.К.* Миокардиодистрофия. Москва: Медицина, 1989. 272 с.
Vasilenko VH, Feldman SB, Khitrov NK. Myocardial dystrophy. Moscow: Meditsina, 1989. 272 p. (In Russ.).
 20. *Компанцев В.А., Биляч Я.И., Компанцев Д.В., Щербакоев Л.И., Оганова М.А.* Изучение фармакологической активности лекарственного средства «Энергодарин». Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010;12(1-8): 2055–2057. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15625555> (получено 12.02.2024).
Kompantsev VA, Bilyach YaI, Kompantsev DV, Shcherbakova LI, Oganova MA. Studying of pharmacological activity of medical product “Energodarin”. Izvestiya of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2010;12(1-8):2055–2057 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15625555> (accessed 12.03.2024).
 21. *Багметова В.В., Кривицкая А.Н., Тюренков И.Н., Берестовицкая В.М., Васильева О.С.* Влияние фенибута и его соли с янтарной кислотой на устойчивость животных к форсированным динамическим и статическим физическим нагрузкам. Фундаментальные исследования. 2012;4-2: 243–246. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17867978> (получено 12.03.2024).
Bagmetova VV, Krivitskaya AN, Tyurenkov IN, Berestovitskaya VM, Vasilyeva OS. The influence of fenibut and its salt with succinic acid on animals’ resistance to forced dynamic and static physical loads. Fundamental Research. 2012;4-2:243–246 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17867978> (accessed 12.03.2024).
 22. *Яглова Н.В., Оберникхин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А.* Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(1):64–70. DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.64-70.
Yaglova NV, Obornikhin SS, Yaglov VV, Timokhina EP, Nazimova SV, Tsomartova DA. Age-dependent changes of mitochondrial structure regulate steroidogenic activity of rat adrenal cortical cells. Clinical and experimental morphology. 2020;9(1):64–70 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.64-70.
 23. *Steinbacher P, Eckl P.* Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. Biomolecules. 2015;5(2):356–77. DOI: 10.3390/biom5020356.
 24. *Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H.* Exercise-induced oxidative stress: friend or foe? J Sport Health Sci. 2020;9(5):415–25. DOI: 10.1016/j.jshs.2020.04.001.
 25. *Gnoni A, Longo S, Gnoni GV, Giudetti AM.* Carnitine in human muscle bioenergetics: can carnitine supplementation improve physical exercise? Molecules. 2020;25(1):182. DOI: 10.3390/molecules25010182.
 26. *Jang J, Park J, Chang H, Lim K.* L-carnitine supplement reduces skeletal muscle atrophy induced by prolonged hindlimb suspension in rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2016;41(12):1240–7. DOI: 10.1139/apnm-2016-0094.
 27. *Fielding R, Riede L, Lugo JP, Bellamine A.* L-carnitine supplementation in recovery after exercise. Nutrients. 2018; 10(3):349. DOI: 10.3390/nu10030349.
 28. *Ravikumar S, Prabhu S, Vani R.* Effects of L-carnitine on the erythrocytes of stored human blood. Transfus Med. 2020;30(3): 215–5. DOI: 10.1111/tme.12645.
 29. *Naderi Noreini S, Malmir M, Ghafarizadeh A, Faraji T, Bayat R.* Protective effect of L-carnitine on apoptosis, DNA fragmentation, membrane integrity and Lipid peroxidation of spermatozoa in the asthenoteratospermic men. Andrologia. 2021;53(2):e13932. DOI: 10.1111/and.13932.
 30. *Раджабкәдиев Р.М., Коростелева М.М., Евстратова В.С., Никитюк Д.Б., Ханферьян Р.А.* L-карнитин: свойства и перспективы применения в спортивной практике. Вопросы питания. 2015;84(3):4–12. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23816223> (получено 12.02.2024).
Radzhabkadiyev RM, Korosteleva MM, Evstratova VS, Nikityuk DB, Khanferyan RA. L-carnitine: properties and perspectives for use in sports practice. Problems of Nutrition. 2015;84(3):4–12 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23816223> (accessed 12.03.2024).

Информация об авторах

Ирина Александровна Хурская – кандидат биологических наук, инженер лаборатории фармакокинетики и таргетной фармакотерапии, старший преподаватель кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева, младший научный сотрудник лаборатории онконанотерапии ИБХ РАН.

Гульнара Фердинантовна Шаймарданова – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

Владимир Павлович Балашов – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева.

Виталий Николаевич Абрамов – кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева.

Алексей Владимирович Балашов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева.

Екатерина Вячеславовна Быстрова – кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева.

Инна Александровна Евстифеева – кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии МГУ им. Н.П. Огарева.

Author information

Irina A. Khutorskaya – Cand. Sci. (Biol.), Engineer, Laboratory of Pharmacokinetics and Targeted Pharmacotherapy, Senior Lecturer, Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University; Junior Researcher, Laboratory of Nanotheranostics in Oncology, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry.
<http://orcid.org/0000-0001-5553-0525>

Gulnara F. Shaymardanova – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Origins of Pathogenesis, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Federal Research Center “Kazan Scientific Center”.
<https://orcid.org/0000-0003-4472-6674>

Vladimir P. Balashov – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University.
<https://orcid.org/0000-0002-9419-1498>

Vitaly N. Abramov – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University.
<https://orcid.org/0009-0000-5830-7425>

Aleksey V. Balashov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University.
<https://orcid.org/0000-0002-3976-4388>

Ekaterina V. Bystrova – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University.
<https://orcid.org/0009-0002-4495-0182>

Inna A. Evstifeeva – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Cytology, Histology and Embryology, National Research Mordovia State University.
<https://orcid.org/0009-0000-7719-0584>

© Nizyaeva N.V., Kulikov I.A., Belousova T.N., Artemieva K.A., Milovanov A.P., Tikhonova N.B.,
Fokina T.V., Milyutina E.R., Borovkova E.I., Geilis I.A., Dobrochotova Yu.E., L.M. Mikhaleva, 2024

DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.76-85

Placenta percreta: placental villous invasion or a form of adhesive disease?

*N.V. Nizyaeva¹, I.A. Kulikov², T.N. Belousova², K.A. Artemieva¹, A.P. Milovanov¹, N.B. Tikhonova¹,
T.V. Fokina¹, E.R. Milyutina², E.I. Borovkova³, I.A. Geilis², Yu.E. Dobrochotova³, L.M. Mikhaleva¹*

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

² Vidnovsky Perinatal Center, Vidnoye, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. According to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification placenta percreta is the most severe form of placenta accreta spectrum (PAS) which is characterized by placental invasion through the entire myometrium and possible involvement of extrauterine tissues. The disease is associated with prior cesarean sections and placenta previa. This paper presents a clinical case of placenta percreta. The diagnosis was made based on ultrasound and MRI and confirmed intraoperatively. Histological examination revealed thinning of the uterine segment, fibrosis of the posterior wall of the bladder, and adhesions between the uterus and the bladder. We aimed to compare clinical, instrumental, and histological data and intraoperative imaging.

Materials and methods. Histological study was performed on paraffin sections (H&E and Mallory staining). We studied immunohistochemistry of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts with antibodies to cytokeratin-8.

Results. MRI and ultrasound examination showed placental invasion extending beyond the serous lining of the uterus and involving the posterior wall of the bladder. At 37 weeks, elective cesarean section and surgical excision of the uterine wall with invaded villi were performed. Histological study revealed invasive cytotrophoblasts in the uterine wall and fibrous bladder wall. Involvement of the bladder wall was due to adhesions and the development of fibrosis.

Conclusion. Trophoblast and villous invasion did not extend beyond the uterus. Placenta percreta can be supposed to be one of the forms of pelvic adhesive diseases.

Keywords: cesarean section, uterine scar, healing of the uterine wall, placenta accreta spectrum, placenta percreta, invasion

Corresponding author: Ksenia A. Artemieva. E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru

For citation: Nizyaeva N.V., Kulikov I.A., Belousova T.N., Artemieva K.A., Milovanov A.P., Tikhonova N.B., Fokina T.V., Milyutina E.R., Borovkova E.I., Geilis I.A., Dobrochotova Yu.E., Mikhaleva L.M. Placenta percreta: placental villous invasion or a form of adhesive disease? Clin. exp. morphology. 2024;13(4):76–85. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.76-85.

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 15.04.2024. **Received in revised form** 24.04.2024. **Accepted** 24.06.2024.

УДК: 618.36-007.274

Placenta percreta: плацентарная ворсинчатая инвазия или вариант спаечной болезни?

*Н.В. Низяева¹, И.А. Куликов², Т.Н. Белоусова², К.А. Артемьева¹, А.П. Милованов¹, Н.Б. Тихонова¹,
Т.В. Фокина¹, Е.Р. Милютинина², Е.И. Боровкова³, И.А. Гейлис², Ю.Е. Доброхотова³, Л.М. Михалева¹*

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

² ГБУЗ МО Видновский перинатальный центр, Видное, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Введение. В соответствии с классификацией Международной федерации акушеров и гинекологов (FIGO) placenta percreta является наиболее тяжелой формой приращения плаценты и характеризуется ее инвазией через всю стенку матки с возможным вовлечением окружающих

тканей. Данное состояние ассоциировано с предшествующим кесаревым сечением и предлежанием плаценты. Представлен клинический случай прорастания плаценты. Диагноз был поставлен на основании данных УЗИ и МРТ и подтвержден интраоперационно. При гистологическом исследовании выявлены истончение сегмента матки, фиброз и наличие спаек между маткой и мочевым пузырем. Цель исследования – сопоставление клинических, инструментальных данных, интраоперационной картины и данных гистологического исследования.

Материалы и методы. Гистологическое исследование проведено на парафиновых срезах (гематоксилин и эозин, окраска по Маллори). Иммуногистохимическое исследование цито- и синцитиотрофобласта осуществляли с применением антител к цитокератину-8.

Результаты. Данные МРТ и УЗИ показали инвазию ворсин плаценты, выходящую за пределы серозной оболочки матки и затрагивающую заднюю стенку мочевого пузыря. Плановое оперативное родоразрешение было выполнено на сроке 37 недель. Проведено хирургическое иссечение стенки матки с инвазированными ворсинами плаценты. Гистологическое исследование выявило инвазивные клетки цитотрофобласта в стенке матки и фиброз стенки мочевого пузыря. Прорастание и вовлечение стенки мочевого пузыря произошли за счет спаек и развития фиброза.

Заключение. Трофобласт и инвазия ворсин не распространялись за пределы матки. По нашему мнению, placenta percreta может быть одним из вариантов спаечной болезни органов малого таза.

Ключевые слова: кесарево сечение, рубец на матке, заживление стенки матки, спектр приросшей плаценты, placenta percreta, инвазия

Для корреспонденции: Ксения Александровна Артемьева. E-mail: artemjeva_ksenia@mail.ru

Для цитирования: Низяева Н.В., Куликов И.А., Белоусова Т.Н., Артемьева К.А., Милованов А.П., Тихонова Н.Б., Фокина Т.В., Милютин Е.Р., Боровкова Е.И., Гейлис И.А., Доброхотова Ю.Е., Михалева Л.М. Placenta percreta: плацентарная ворсинчатая инвазия или вариант спаечной болезни? Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):76–85 (англ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.76-85.

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 15.04.2024. Получена после рецензирования 24.04.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Introduction

The term “placenta accreta” was coined in the 20th century, when scientists F.C. Irving and A.F. Hertig defined it as “abnormal partial or complete attachment of the placenta to the wall of the uterus” [1]. Abnormal attachment and invasion of placenta villi manifest in their inability to separate from the wall of the uterus.

According to the FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics) classification, there are 3 major categories of placenta accreta spectrum (PAS) disorders according to the degree of invasiveness and local tissue destruction. Grade 1 is abnormally adherent placenta (pl. accreta) when villi adhere directly to the myometrium without the decidual interface. Grade 2 implies abnormally invasive placentation (pl. increta) when villi invade the myometrium. Grade 3 is abnormally invasive placentation (pl. percreta) when villi invade the full thickness of the uterine wall either to the serosa or beyond it. Grade 3 is subcategorized into grade 3a, where trophoblasts and placental villi are limited to and include the uterine serosa; grade 3b with placental invasion into the urinary bladder; and grade 3c, when placental villi invade other pelvic tissues [2]. PAS is a dangerous complication of pregnancy that is associated with a high risk of massive blood loss and increases maternal morbidity and mortality.

In recent years, the rate of PAS has grown significantly from 1 in 1,200 [3] through 1 in 250 to 1 in 500 worldwide [4–6]. Observational studies in the United States reported the rate of 1 to 272 in 2016 [7]. The most thoroughly studied and proven factor leading to an increased PAS incidence is the number of previous cesarean sections (CSs) [2]. “Risk factors for PAS were 3%, 11%, 40%, 61%, and 67% for the first, second, third, fourth, and fifth CSs, respectively” [5]. Uterine scar dehiscence represents an incomplete disruption of the uterine wall at the site of previous cesarean delivery and typically occurs within the anterior lower uterine segment overlying the bladder [8–12].

Risk factors for PAS include a patient’s history of multiple uterine surgeries (myomectomy, hysteroscopy, curettage), uterine artery embolization, placenta previa, PAS [10], and metabolic disorders [11–12]. These risk factors can initiate inflammation and lead to incomplete regeneration of damaged tissues in the future [4].

Case report

Patient O., 37 years old, was admitted to the Department of Perinatal Pregnancy at Vidnovsky Perinatal Center in 2022 to receive therapy for prolonging pregnancy. On admission, she was at 33 weeks and 2 days of gestation.

The pregnant woman gave her consent to participate in a biomedical study (in compliance with the Declaration of

Helsinki) and publish pictures and personal information in this case report. The research was approved by the Local Bioethics Committee (protocol No. 231 dated 28.08.2023).

Parity and history of present illness

The patient had 5 pregnancies in total. In 2007, the first healthy baby (a girl, 2,900 grams) was delivered after spontaneous labor at 38 weeks. In 2012, the second healthy baby (a boy, 2,690 grams) was born after urgent spontaneous delivery. In 2013, the patient delivered the third healthy baby (a boy, 4,200 grams) at 38 weeks. The patient underwent an emergency CS due to a narrow pelvis. In 2020, the woman had the fourth pregnancy complicated by severe preeclampsia. The patient underwent operative vaginal delivery at 35 weeks and gave birth to a healthy girl (2,600 grams).

The last pregnancy was natural. The woman had a singleton pregnancy complicated by placenta previa. The fetus was in the cephalic position. Ultrasound examination showed the patient to have placenta villi invaded the uterine scar and the bladder wall after previous CSs. The uterine scar was unstable and accompanied by the formation of a uterine hernia-like prolapse.

The first trimester was uncomplicated. Ultrasound examination at 13 weeks and 6 days visualized chorionic villi position on the uterine scar niche. No markers of preeclampsia were identified. Ultrasound examination at 19 weeks and 6 days showed a 1.6-mm myometrium in the area of the uterine scar dehiscence and revealed placenta previa.

At 33 weeks, the patient was admitted to hospital because of elevated risk of premature labor. Having been hospitalized, the patient had an ultrasound examination and

MRI done. Ultrasound examination was performed using a transabdominal and transvaginal device (MEDISON ACCUVIX A30-RUS 2014, Korea) and an ultrasound diagnostic device (Samsung-Medison WS80A-RUS 2019, Korea). The retroplacental myometrium was 158x133 mm large. Aberrant vessels penetrated the serosa of the bladder (Fig. 1). The placenta had diffuse thickening of up to 46 mm and was located along the anterior wall, its lower edge overlapping the area of the internal os. High risk of placental invasion into the bladder was detected.

MRI was performed with MAGNETOM Verio (Siemens AG, Erlangen, Germany) with the power of 3T clinical imaging and standard surface coils. Scanning was performed according to the routine protocol [13–14]. We received T2-weighted images obtained in three mutually perpendicular planes, a slice thickness being 3–4 mm and the field of view being 32–42 cm; T2-weighted images with signal suppression from adipose tissue in the axial plane; T1-weighted images in sagittal and axial planes; T1-weighted images with suppression of MR signal intensity from adipose tissue in any plane; and diffusion-weighted images. The results were interpreted with a unified scoring system MAPI-RADS (Morbidly Adherent Placenta Imaging Reporting and Data System) [15] (Fig. 2A–C).

Ultrasound examination and MRI detected changes associated with neoangio- and vasculogenesis including large retroplacental blood vessels in combination with local thinning of the uterine wall in its anterior area adjacent to the bladder and hernia-like protrusion of the uterine wall, or “uterine window” (Fig. 2A–C).

MRI revealed placenta percreta of class 5 (according to MAPI-RADS). Considering the depth of the placental invasion and the high risk of intraoperative massive blood loss,

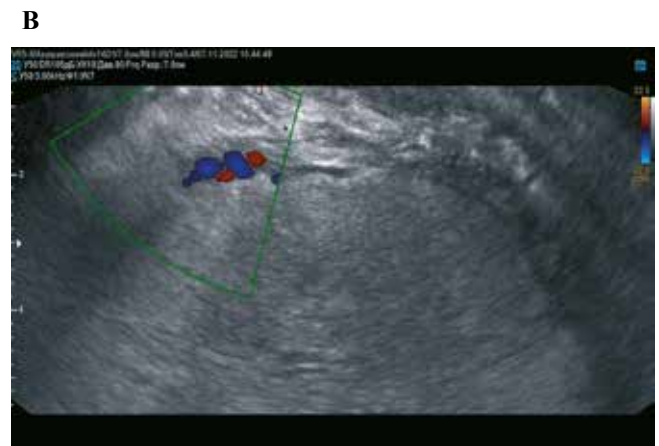


Fig. 1. Ultrasound signs of placenta percreta.

A – protrusion of the placenta beyond the uterine wall, absence of retroplacental myometrium, B – aberrant vessels located perpendicular to the wall of the bladder

Рис. 1. Ультразвуковые признаки placenta percreta.

A – распространение плаценты за стенку матки, отсутствие ретроплацентарного миометрия, B – aberrantные сосуды расположены перпендикулярно стенке мочевого пузыря

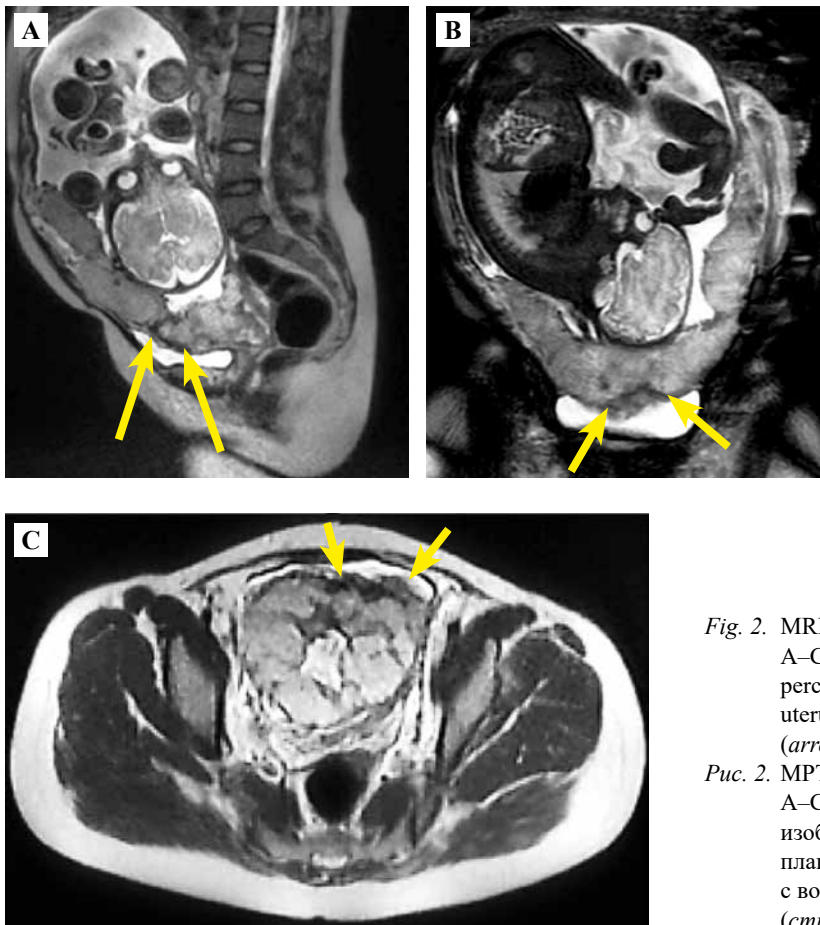


Fig. 2. MRI T2WI in the Cor, Sag, and Ax planes.

A–C – the zone of deep placenta increta. Placenta percreta spreads beyond the serous membrane of the uterus involving the posterior wall of the bladder (arrows)

Рис. 2. МРТ T2VI в плоскости Cor, Sag, Ax.

А–С – зона глубокого врастания плаценты. На МРТ изображении определяется распространение плаценты за пределы серозной оболочки матки с вовлечением задней стенки мочевого пузыря (стрелки)

a planned abdominal delivery was performed at 37 weeks of pregnancy using proprietary technique, which involves combining homeostatic tourniquets and a Zhukovsky double-balloon obstetric catheter (Fig. 3A–D) [16]. (Further description of the improved methodology of organ preserving operations was given in the article “A method of surgical delivery of patients with placenta ingrowth in the uterine scar” [16].)

A midline laparotomy and CS in the area of the uterine fundus were performed. A healthy full-term baby with the Apgar score of 7–8 points was removed from the uterine cavity (a boy; 3,890 g; 51 cm). There was no separation of the placenta. Both the uterus and the bladder were sewed up in two rows each with separate vicryl sutures. Intraoperative blood loss was 1,547 ml. The patient had two 1,000-ml doses of autoplasm transfused. Intraoperatively, 1,281 ml of blood were collected and 336 ml of autologous red blood cells were reinfused.

We did CS under epidural anesthesia with subsequent transition to endotracheal anesthesia at the stage of metroplasty. Midline laparotomy having been performed, a segment of the thinned myometrium was sent to the laboratory for further examination. Local prolapse of the uterine wall (200×200 mm) with a pronounced vascular network was visualized (Fig. 3 A, B). The first tourniquet was applied above the uterine hernia-like prolapse in the area of the

trigone. The mobilization of the bladder was difficult due to placental invasion and severe tissue fibrosis. Below the uterine prolapse, the second uterine tourniquet was placed to grasp the bladder in the area of the trigone. The uterine hernia-like prolapse with an area of placental invasion was excised. Sixty millimeters of the posterior wall of the bladder were resected (Fig. 3 C). The postoperative period was uncomplicated and lasted 7 days.

The extracted placenta with myometrium fragments attached to it were sent for further examination (Fig. 3 D).

Gross examination

Without membranes and the umbilical cord, the placenta weighed 420 g and was 18×14×2.5 cm large. At the edge, where the myometrium was attached to the maternal surface of the placenta, it was 60×40 mm and its thickness varied from 15 mm to less than 1 mm at the serous uterine layer. Adjacent to the removed uterine wall, there was a grayish area similar to the mucous membrane of the bladder.

Histological examination

For histological examination, the samples of myometrium and placenta were fixed in 10% buffered formalin (#60-001/S, BioVitrum LLC, Russia). The samples were washed, dehydrated, and embedded in Histomix Extra

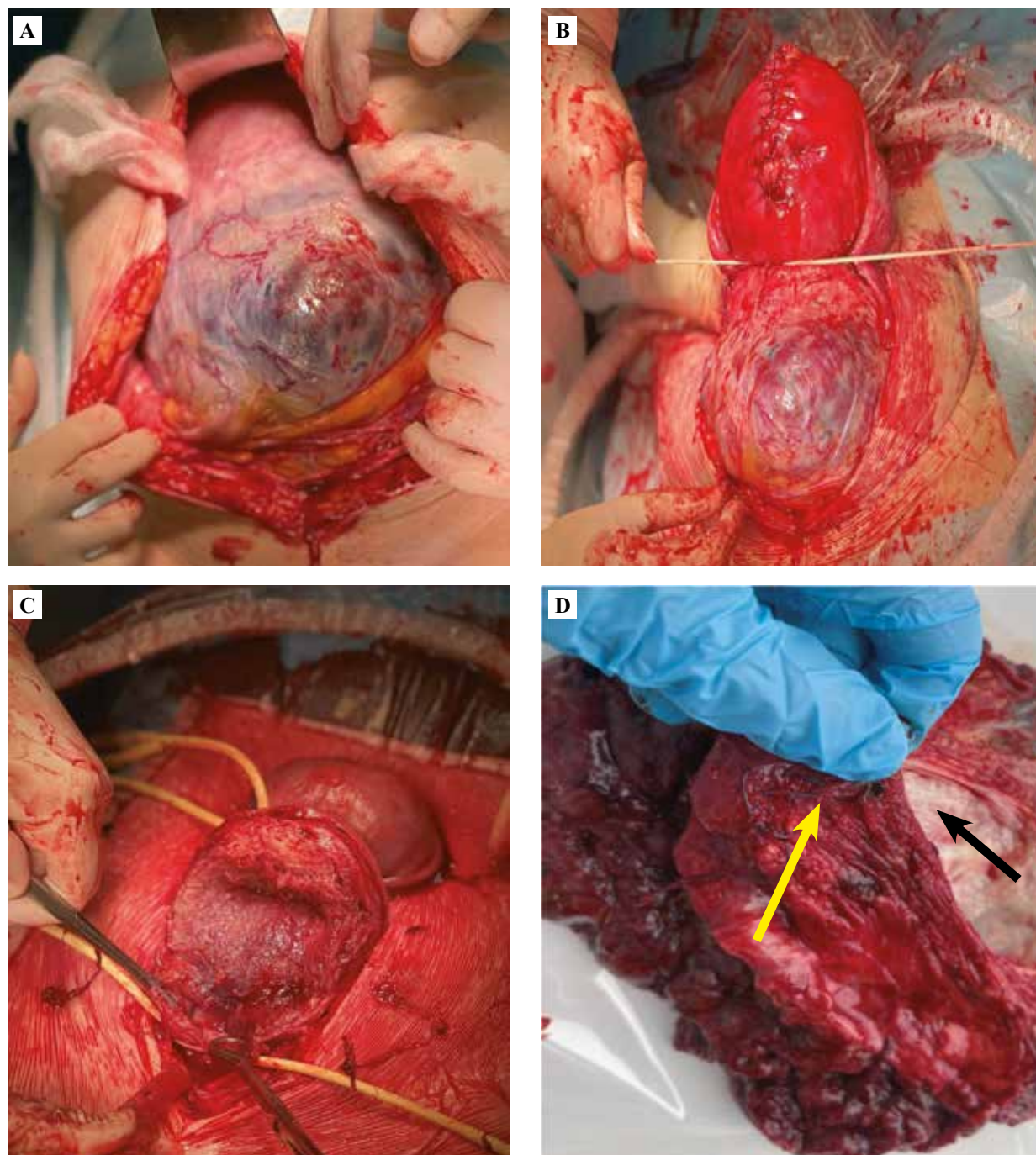


Fig. 3. Proprietary surgical technique for PAS. Intraoperative view.

A – intraoperative view of a hernia-like prolapse of the uterine wall. B – The first tourniquet was placed over the area of invaded placental villi into the uterine scar in the fundus area. C – the bladder was mobilized up to the border of the healthy tissue. The site of placental villi invaded into the myometrium was excised between two tourniquets, then bladder resection was performed. Note that there was no bleeding between tourniquets. D – maternal surface of the placenta with attached myometrium zone (placental villi invaded into the myometrium), as well as a resected area of the bladder (*yellow arrow* shows the posterior wall of the bladder; *black arrow* shows the mucous layer of the bladder)

Рис. 3. Авторская методика хирургического лечения PAS. Интраоперационный вид.

А – интраоперационный вид грыжеподобного выпячивания стенки матки. В – первый турникет наложен на область инвазии ворсин плаценты в рубец в области дна матки. С – мочевой пузырь мобилизован до границы здоровых тканей. Участок внедрения ворсин плаценты в миометрий иссечен между двумя наложенными турникетами; выполнена резекция мочевого пузыря. Обращает на себя внимание отсутствие между турникетами кровотечения. D – материнская поверхность плаценты с прикрепленной зоной миометрия (ворсины плаценты внедряются в миометрий), резецированный участок мочевого пузыря (*желтая стрелка* указывает на заднюю стенку мочевого пузыря; *черная стрелка* указывает на слизистую оболочку мочевого пузыря)

paraffin (#10342, BioVitrum LLC, Russia) after 24 hours of fixation. The 4- μ m thick paraffin slides were prepared with a rotary microtome (Sakura, Japan), deparaffinized and rehydrated in a graded ethanol series, washed in water, and stained with hematoxylin and eosin (#07-006, BioVitrum LLC, Russia) and Mallory trichrome kit (#21-036, BioVitrum LLC, Russia). Then they were dehydrated and placed in Vitrogel (#12-005, BioVitrum LLC, Russia) for further microscopic examination.

Immunohistochemical study

The sections from the paraffin blocks were mounted on lysine-coated glass slides (Menzel-Gläser Polysine®, Thermo Scientific, USA) and rehydrated. Then they underwent heat-induced antigen retrieval in citrate solution (pH 6.0) and were blocked (1h at RT in 10% goat serum + 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies specifically interacting with the antigen on the section. Finally, they were washed with a phosphate buffer. We found the products of interaction of primary antibodies with the antigen using the horseradish peroxidase conjugate specifically bound to secondary anti-species antibodies. We used Novolink™ Polymer Reagent Kit (Leica Biosystems, Germany) to detect bound primary antibodies (#RE7150, Leica, UK), counter-staining with Mayer's hematoxylin solution (BioVitrum LLC, Russia, article No. 05-002/S), dehydration in a graded ethanol series, and mounting with Vitrogel (BioVitrum LLC, Russia, article No. 05-002/S). An aqueous solution of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride was used to stain the product of immunohistochemical reactions.

To detect epithelial cells, we carried out an immunohistochemical study with primary mouse monoclonal antibody to cytokeratin 8 (cat# DB098-RTU, DB Biotech, Košice, Slovakia). The presence of brown staining cells indicated positive immunohistochemical reaction. To check for negative immunohistochemical reaction, the sections were subjected to standard immunohistochemical procedure without being incubated with primary antibodies. We performed microscopic examination using the Leica microscope system which consists of Leica DM2500 microscope, Leica DFC290 video camera image microscopy, analysis software, and Image Scope M (Leica, Germany).

On histological examination, we determined that the lower uterine segment was thinned to the serous coat of the uterus and had invaded villi and an uneven layer of borderline fibrinoid. In the decidual lamina, there were vast deposits of fibrinoid and few decidual cells (Fig. 4). In the myometrium of uteroplacental area, we found multiple villi with dystrophic changes, including the loss of basophilia of nuclei coated in fibrinoid ("villi – shadows"), with cytotrophoblast remnants (Fig. 4–5). Mature intermediate villi dominated in the villous tree and corresponded to the gestational age.

We revealed a moderate local lymphoid infiltration and vasculitis (signs of chronic cystitis) in the bladder wall

and observed small foci of squamous metaplasia in the transitional epithelium. We also detected separate muscle bundles, edematous serous membrane with local microvascular thrombosis and/or adjacent retroplacental hematoma zone, and a large retrochorial hematoma reaching the serous uterine membrane (Fig. 4–5).

On immunohistochemical examination with primary antibody to cytokeratin-8, we detected invasive cytotrophoblast cells in the uterine wall located up to the subserosal layer, including those reaching the adventitia of the walls of subserosal vessels (Fig. 5 A, B), as well as multinucleated giant cells (Fig. 5 C). Multinucleated giant cells are known to be associated with invasion cessation because in normal pregnancy, they are located at the border of invasion [17].

We also found large deposits of fibrinoid in the uteroplacental region. The fibrinoid is known to be a combined product of coagulation of plasma proteins and trophoblastic secretion [18]. We detected an increased amount of fibrinoid, multiple hemorrhages, and damaged areas in the uteroplacental region, which significantly damaged the normal structure of the myometrium [19]. In addition, multiple placental villi were found to be covered with fetal fibrinoid, and trophoblast cells were CK+. Trophoblast cells were the only ones to survive in the uterine wall.

Discussion

The obtained results question how invasive placentation should be interpreted according to the latest FIGO classification. Ultrasound and intraoperative data have shown close interactions between the wall of the uterus and the bladder. Histological examination did not confirm the presence of trophoblast cells and placental villi in the bladder wall or the parametrium, but showed fibrosis of the wall. We assume that it is not placenta percreta but it is the formation of adhesions between the uterine wall and the bladder. The wall of the bladder was attached to the wall of the uterus with connective tissue that has proliferated, which may be considered a form of pelvic adhesive disease. The structures smaller than 1 mm are thought to be visualized on weekly ultrasound examination and MRI. Visual examination methods are not likely to determine the thinned layer of the myometrium, and a false impression is created that the placental villi extend beyond the uterine wall. Should these lesions be classified as a controversial form of placenta percreta? Or should this form be left as a clinical one for diagnosis using instrumental methods (ultrasound and MRI) in order to assess surgical complexity and the risks of bleeding? Ultrasound and MRI data allow one to evaluate not only the depth of placental invasion into the myometrium, but also how much blood vessels of the uteroplacental area and the pelvis are involved and adhesions and collaterals between organs form. The operation with two tourniquets and Zhukovsky double-balloon obstetric catheter may be used at different depths of placental invasion.

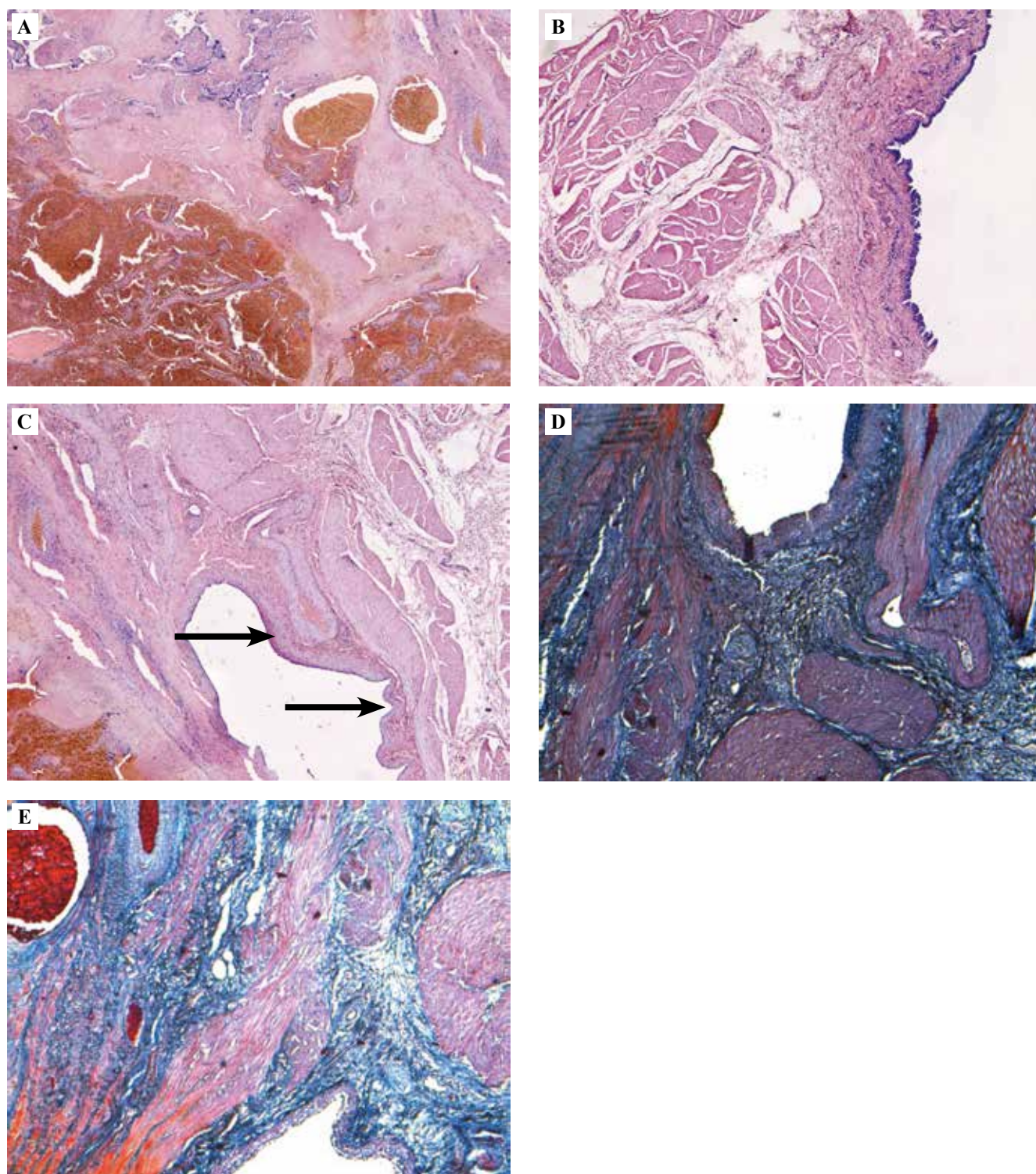


Fig. 4. Histological examination of the uteroplacental region.

A – uteroplacental region with the attached bladder wall, B – The mucous membrane of the bladder is lined with transitional epithelium, C – the lumen of the vessel (*arrows*). D, E – the area where the bladder wall attaches to the thinned uteroplacental segment; the area of fibrosis is visible. A–C – H&E stain, ×50. D, E – Mallory staining: smooth muscle cells (purple), connective tissue (blue), ×50

Рис. 4. Гистологическое исследование маточно-плацентарной области.

A – маточно-плацентарная область с прикрепленной стенкой мочевого пузыря, B – слизистая оболочка мочевого пузыря выстлана эпителием переходного типа, C – просвет сосуда отмечен *стрелками*. D, E – область прикрепления стенки мочевого пузыря к истонченному маточно-плацентарному сегменту, виден участок фиброза. A–C – окраска гематоксилином и эозином, ×50. D, E – окраска по Маллори: гладкомышечные клетки были фиолетовыми, соединительная ткань – синей, ×50

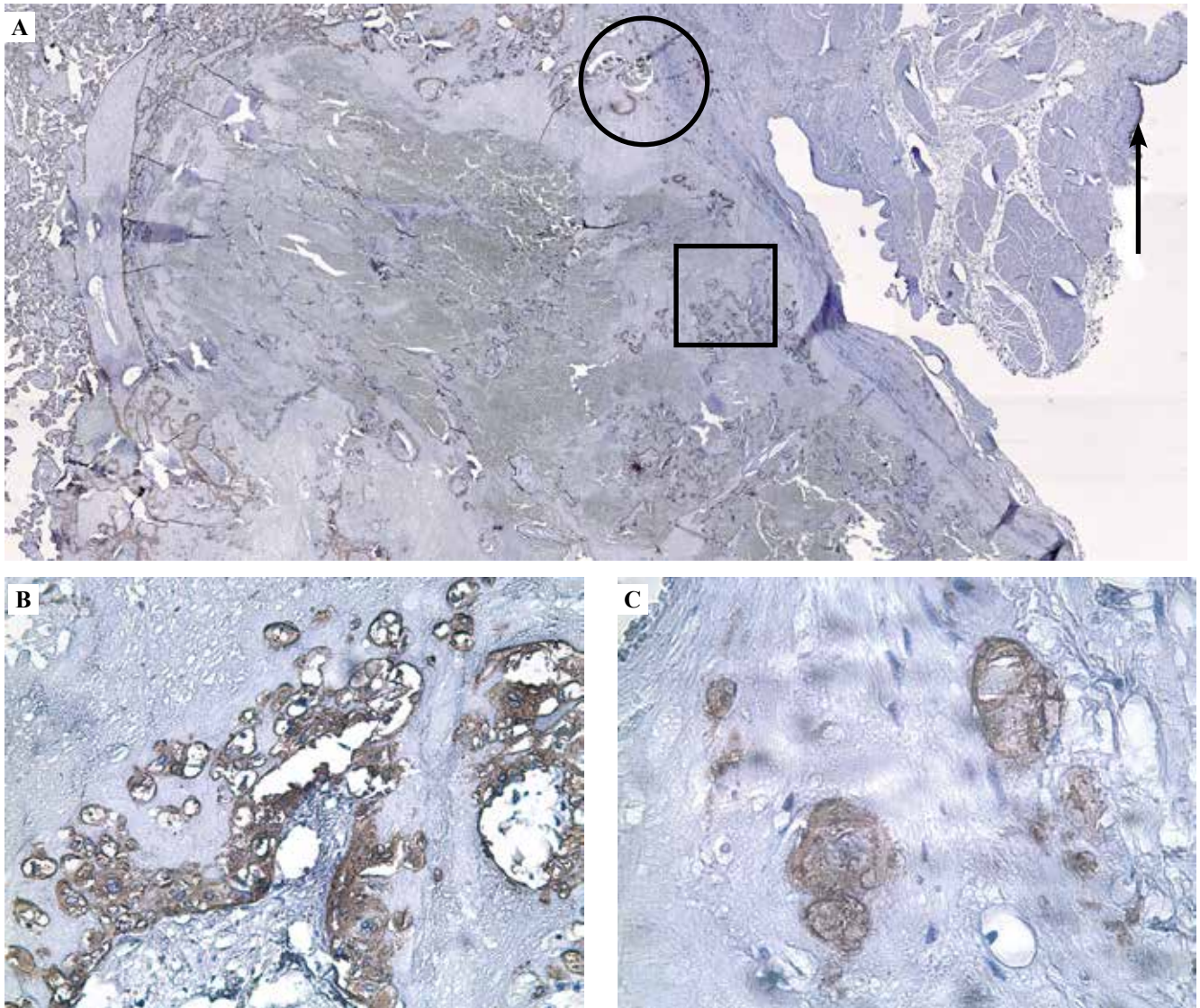


Fig. 5. Immunohistochemical staining with primary antibodies to cytokeratin-8 (CK8).

A – uteroplacental region with the attached bladder wall. Invasive trophoblast at the border between the uterus and the bladder (arrow, brown), $\times 50$. B – preserved placental villi and trophoblast cells in a fibrinoid in the uterine wall (brown staining), (the area in the square in Fig. A), $\times 200$. C – CK8+ trophoblast cells and multinucleated cells in the vascular wall of the myometrium, (the area in the circle in Fig. A), $\times 400$

Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием первичных антител к цитокератину-8 (СК8)

А – маточно-плацентарная область с вовлеченной задней стенкой мочевого пузыря. Инвазивный трофобласт на границе матки и мочевого пузыря (отмечен стрелкой; окрашен в коричневый цвет), $\times 50$. В – сохранившиеся ворсинки плаценты и клетки трофобласта, замурованные в фибриноид, в стенке матки (коричневое окрашивание) (отмечено квадратом на рис. А), $\times 200$; С – клетки трофобласта СК8+ и многоядерные клетки в стенке сосуда (отмечено кругом на рис. А), $\times 400$

Conclusion

Pathologists should use an integrated approach taking into account the findings of visual diagnostic methods (ultrasound and MRI), intraoperative view, and histological data. This case report showed a new comprehensive approach to morphological verification of PAS. Such clinical cases should be thoroughly analyzed to be considered in the future when making amendments to the FIGO classification.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Nizyaeva, I.A. Kulikov, A.P. Milovanov, T.N. Belousova.

Collected the data and performed the analysis – T.V. Fokina, A.P. Milovanov, I.A. Kulikov, E.R. Milyutina.

Wrote the paper – N.V. Nizyaeva, N.B. Tikhonova.

Edited the manuscript – E.I. Borovkova, I.A. Geilis,

Yu.E. Dobrochotova, K.A. Artemieva, L.M. Mikhaleva.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Низяева, И.А. Куликов, А.П. Милованов, Т.Н. Белоусова.

Сбор и обработка материала – Т.В. Фокина, А.П. Милованов, И.А. Куликов, Е.Р. Милютинина.

Написание текста – Н.В. Низяева, Н.Б. Тихонова.

Редактирование – Е.И. Боровкова, И.А. Гейлис,

Ю.Е. Доброхотова, К.А. Артемьева, Л.М. Михалева.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References/Литература

1. *Irving C, Hertig AT.* A study of placenta accreta. *Surg Gynecol Obstet.* 1937;64:178–200. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:86540635> (accessed 08.04.2024).
2. *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.
3. *Morlando M, Sarno L, Napolitano R, Capone A, Tessitore G, Maruotti GM et al.* Placenta accreta: incidence and risk factors in an area with a particularly high rate of cesarean section. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013;92(4):457–60. DOI: 10.1111/aogs.12080.
4. *Carusi DA.* The placenta accreta spectrum: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2018;61(4):733–42. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000391.
5. *Silver RM, Landon MB, Rouse DJ, Leveno KJ, Spong CY, Thom EA et al.* Maternal morbidity associated with multiple repeat cesarean deliveries. *Obstet Gynecol.* 2006;107(6):1226–32. DOI: 10.1097/01.AOG.0000219750.79480.84.
6. *Upton K, Silver RM, Greene R, Lutomski J, Holt VL.* Placenta accreta and maternal morbidity in the Republic of Ireland, 2005–2010. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27(1):24–9. DOI: 10.3109/14767058.2013.799654.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine. *Obstetric Care Consensus No. 7: placenta accreta spectrum.* *Obstet Gynecol.* 2018;132(6):e259–75. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002983.
8. *Hecht JL, Baergen R, Ernst LM, Katzman PJ, Jacques SM, Jauniaux E et al.* Classification and reporting guidelines for the pathology diagnosis of placenta accreta spectrum (PAS) disorders: recommendations from an expert panel. *Mod Pathol.* 2020;33(12):2382–96. DOI: 10.1038/s41379-020-0569-1.
9. *Zhu Z, Li H, Zhang J.* Uterine dehiscence in pregnant with previous caesarean delivery. *Ann Med.* 2021;53(1):1265–9. DOI: 10.1080/07853890.2021.1959049.
10. *Jauniaux E, Bhide A.* Prenatal ultrasound diagnosis and outcome of placenta previa accreta after cesarean delivery: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(1):27–36. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.050.
11. *Habek D, Cerovac A, Luetić A, Marton I, Prka M, Kulaš T, Ujević B.* Modified Stark’s (Misgav Ladach) caesarean section: 15-year experience of the own techniques of caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;247:90–3. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.02.026.23.
12. *Antila-Långsjö RM, Mäenpää JU, Huhtala HS, Tomás EI, Staff SM.* Cesarean scar defect: a prospective study on risk factors. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;219(5):458.e1–8. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.09.004.
13. *Jha P, Pöder L, Bourgioti C, Bharwani N, Lewis S, Kamath A et al.* Society of Abdominal Radiology (SAR) and European Society of Urogenital Radiology (ESUR) joint consensus statement for MR imaging of placenta accreta spectrum disorders. *Eur Radiol.* 2020;30(5):2604–15. DOI: 10.1007/s00330-019-06617-7.
14. *Dighe M.* MR Imaging of abnormal placentation. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2017;25(3):601–10. DOI: 10.1016/j.mric.2017.03.002.
15. *Uchevatkina PV, Bychenko VG, Kulabukhova EA, Luzhina IA, Shmakov RG.* System of a unified approach to interpretation of magnetic resonance tomography in diagnostics of pathological placental attachment “MAPI-RADS” (morbidly adherent placenta imaging reporting and data system). *Russian Electronic Journal of Radiology.* 2021;11(1):174–90. DOI: 10.21569/2222-7415-2021-11-1-174-190.
16. И.А. Куликов, Т.Н. Белоусова, Н.И. Соваев, Е.Н. Плахотина, С.В. Мусаева, К.С. Павлютина, А.Е. Петров. Способ оперативного родоразрешения пациенток с вращением плаценты в рубец на матке. Патент Российской Федерации № RU 2706368 С1. Заявитель и патентообладатель И.А. Куликов. Заявл. от 18.06.2019; опубл. 18.11.2019, Бюл. № 32. IA Kulikov, TN Belousova, NI Sovaev, EN Plakhotina, SV MUSAeva, KM Pavlyutina, AE Petrov. A method of surgical delivery of patients with placenta ingrowth in the uterine scar. Patent No. 2706368 Russian Federation. Applicant and patent holder is I.A. Kulikov – No. RU 2706368 C1. Application 18.06.2019; publ. 18.11.2019. Bul. No. 32.
17. *Милованов А.П., Аксененко В.А., Лукашевич А.А., Фокина Т.В., Степанова И.И., Тихонова Н.Б.* Ведущая роль рубцов после кесарева сечения в патогенезе предлежания плаценты с ворсинками. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2019;8(1):10–18. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-10-18. *Milovanov AP, Akseenenko VA, Lukashevich AA, Fokina TV, Stepanova II, Tikhonova NB.* The leading role of scars after the caesarian section in the pathogenesis of placenta previa accreta. *Clinical and experimental morphology.* 2019;8(1):10–18 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-10-18.
18. *Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN.* Pathology of the human placenta. 6th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. 939 p. DOI: 10.1007/978-3-642-23941-0.
19. *Маркрян Н.М., Вандышева П.А., Низяева Н.В., Гюева З.В., Михалев С.А., Хамошина М.Б. и др.* Клинико-морфологическая оценка рубцов на матке после кесарева сечения у пациенток с гинекологическими и экстрагенитальными заболеваниями. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(1):34–45. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.34-45. *Markaryan NM, Vandysheva RA, Nizyaeva NV, Gioeva ZV, Mikhalev SA, Khamoshina MB et al.* Clinical and morphological assessment of uterine scars after caesarean section in patients with gynecological and extragenital diseases. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):34–45 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.34-45.

Author information

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>

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

Tamara N. Belousova – Cand. Sci. (Med.), Medical Director, Vidnovsky Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0003-3804-7691>

Ksenia A. Artemieva – 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. Milovanov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-8804-0258>

Nataliia B. Tikhonova – 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/0000-0001-5437-6933>

Tatyana V. Fokina – 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/0000-0002-2467-7660>

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

Ekaterina I. Borovkova – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Pirogov Russian National Research Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-7140-262X>

Irina A. Geilis – Head of the Department of Antenatal Fetal Protection and Perinatal Diagnostics, Vidnovsky Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0002-5000-8647>

Yulia E. Dobrochotova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Pirogov Russian National Research Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-6571-3448>

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>

Информация об авторах

Наталья Викторовна Низяева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

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

Тамара Николаевна Белоусова – кандидат медицинских наук, главный врач 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 Петрович Милованов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

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

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

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

Екатерина Игоревна Боровкова – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Ирина Александровна Гейлис – заведующая отделением антенатальной охраны плода и перинатальной диагностики Видновского перинатального центра.

Юлия Эдуардовна Доброхотова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

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.

Фиброэпителиальный стромальный полип вульвы с атипичными клетками, ассоциированный с беременностью

*Е.Л. Казачков^{1,2}, М.К. Лебедева^{1,2}, Д.В. Гоголева^{1,2}, Г.В. Сычугов^{1,2},
Э.А. Казачкова¹, Ю.А. Медведева¹, А.А. Дуб¹*

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

² ГБУЗ Челябинское областное патологоанатомическое бюро, Челябинск, Россия

Резюме. Приведено редкое наблюдение фиброэпителиального стромального полипа вульвы с атипичными клетками, развившегося у 43-летней женщины во время второй половины беременности и симулировавшего злокачественное новообразование. Подчеркивается опасность ошибочной интерпретации фиброэпителиального стромального полипа вульвы как злокачественной опухоли. Описаны подходы к иммуногистохимической диагностике фиброэпителиального стромального полипа вульвы. Показано, что для верификации этого новообразования необходимо иммуногистохимическое исследование с маркерами Ki67, Vimentin, panCytokeratin, S-100, CD34, Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, SMA, Desmin, CD10. На доброкачественный характер поражения указывают анамнестические данные о появлении и развитии фиброэпителиального стромального полипа вульвы в период беременности, а также результаты иммуногистохимического исследования, демонстрирующие экспрессию рецепторов к женским половым гормонам в стромальных клетках. Подчеркивается необходимость динамического наблюдения за пациенткой для исключения местных признаков малигнизации в зоне хирургического вмешательства и своевременной диагностики рецидива.

Ключевые слова: фиброэпителиальный стромальный полип вульвы, беременность, патологическая анатомия

Для корреспонденции: Евгений Леонидович Казачков. E-mail: doctorkel@yandex.ru

Для цитирования: Казачков Е.Л., Лебедева М.К., Гоголева Д.В., Сычугов Г.В., Казачкова Э.А., Медведева Ю.А., Дуб А.А. Фиброэпителиальный стромальный полип вульвы с атипичными клетками, ассоциированный с беременностью. Клини. экп. морфология. 2024;13(4):86–91. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.4.86-91.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках комплексной темы НИР Южно-Уральского государственного медицинского университета «Патоморфологическая характеристика, морфогенез и патоморфоз инфекционных и неинфекционных заболеваний человека и аспекты полиморбидности у населения Южного Урала» (№ 122090900047-6).

Статья поступила 27.05.2024. **Получена после рецензирования** 20.06.2024. **Принята в печать** 24.06.2024.

Fibroepithelial stromal polyp of the vulva with atypical cells associated with pregnancy

*E.L. Kazachkov^{1,2}, M.K. Lebedeva^{1,2}, D.V. Gogoleva^{1,2}, G.V. Sychugov^{1,2},
E.A. Kazachkova¹, U.A. Medvedeva¹, A.A. Dub¹*

¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Department of Pathology, Chelyabinsk, Russia

Abstract. We present a rare observation of a fibroepithelial stromal polyp of the vulva with atypical cells which developed in a 43-year-old woman during the second half of pregnancy and simulated malignancy. The risk of misinterpreting a fibroepithelial stromal polyp of the vulva as a malignant tumor is emphasized. The article describes approaches to differential immunohistochemical diagnosis of a fibroepithelial stromal polyp of the vulva. It is shown that immunohistochemical study with markers Ki67, Vimentin, panCytokeratin, S-100, CD34, Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, SMA, Desmin, and CD10 is necessary to verify this neoplasm. The benign nature of the lesion is indicated by data from a medical history on the appearance

and development of a fibroepithelial stromal polyp of the vulva during pregnancy, as well as the results of immunohistochemical study demonstrating the expression of receptors to female sex hormones in stromal cells. We underscore the necessity of a follow-up of the patient over time to exclude local signs of malignization in the area of surgical intervention and timely diagnosis of recurrence.

Keywords: fibroepithelial stromal polyp of the vulva, pregnancy, anatomic pathology

Corresponding author: Evgeniy L. Kazachkov. E-mail: doctorkel@yandex.ru

For citation: Kazachkov E.L., Lebedeva M.K., Gogoleva D.V., Sychugov G.V., Kazachkova E.A., Medvedeva U.A., Dub A.A. Fibroepithelial stromal polyp of the vulva with atypical cells associated with pregnancy. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(4):86–91 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.86-91.

Funding. The study was carried out within the framework of the complex theme of the research work of South Ural State Medical University “Pathomorphological characterization, morphogenesis and pathomorphosis of infectious and non-infectious human diseases and aspects of polymorbidity in the population of the Southern Urals” (No. 122090900047-6).

Received 27.05.2024. **Received in revised form** 20.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Фиброэпителиальный стромальный полип (ФСП) – доброкачественное полиповидное новообразование мезенхимального происхождения [1], состоящее из трех компонентов: стромы, формирующей ножку полипа, фиброваскулярной основы и покровного эпителия. ФСП встречается в желудочно-кишечном тракте, на коже, в миндалинах [2], а также в органах нижних отделов мочевой системы (мочевой пузырь, уретра) и женской половой системы (влагалище, вульва, реже шейки матки) [1, 3–5]. Зачастую это солитарное образование, иногда на ножке, плотноэластической консистенции. Микроскопически для него характерны звездчатые и многоядерные стромальные клетки, которые имеют тенденцию к скоплению вдоль эпидермально-стромальной границы и вокруг кровеносных сосудов фиброваскулярной основы [6]. Выделяют два гистологических варианта ФСП: гипоклеточный, состоящий из веретеновидных уни- и биполярных клеток, и гиперклеточный – с выраженным ядерным полиморфизмом и частыми митозами [7]. Одной из характерных и признанных особенностей таких образований является появление в части из них выраженной атипичности стромальных клеток, и хотя данное обстоятельство не должно расцениваться как признак малигнизации, это зачастую приводит к гипердиагностике злокачественной опухоли [1, 8]. Сочетание в ФСП гиперклеточности, большого количества причудливых многоядерных стромальных клеток и патологических митозов, ассоциированных с беременностью, описывают в литературе крайне редко [5, 9, 10], в связи с чем мы представляем собственное наблюдение ФСП вульвы с атипичными клетками у беременной пациентки, симулирующего злокачественное новообразование мезенхимального происхождения. Пациентка дала информированное согласие на публикацию этого наблюдения в открытой печати.

Клиническое наблюдение

Пациентка Р., 43 года. Соматический статус: ожирение II степени, диффузный нетоксический зоб I-й сте-

пени, эутиреоз. Акушерский анамнез: шесть беременностей, три самопроизвольных выкидыша, трое родов. Гестационная артериальная гипертензия и гестационный сахарный диабет во время последней беременности, закончившейся своевременными родами без осложнений. При анализе медицинской документации установлено, что в ходе гинекологического осмотра на 22-й неделе последней беременности какие-либо новообразования вульвы не обнаружены. Обследована на инфекции, передающиеся половым путем, – патология не выявлена. За две недели до родов в области задней спайки на коже промежности было выявлено образование плотноэластической консистенции на широком основании, грибовидной формы, белесоватое, безболезненное, до 2,5 см в диаметре. На третий день послеродового периода под местной анестезией проведено иссечение данного образования в пределах здоровых тканей.

В патологоанатомическую лабораторию прислан фрагмент кожи с узлом серо-белого цвета, на широкой короткой ножке, плотноэластической консистенции, грибовидной формы, размерами до 2,5×2,0 см. При гистологическом исследовании образование без четких границ, покрыто многослойным плоским неороговевающим эпителием с сохраненной стратификацией и явлениями легкого акантоза. Стромальный компонент неравномерной клеточной плотности (рис. 1 А). Клетки в центральной зоне плеоморфные, нередко многоядерные, с явлениями выраженной атипичности, иногда с картинами митозов патологического типа (рис. 1 В). В поверхностных отделах дермы подобные клетки с атипичными характеристиками не обнаружены. Волокна стромы формируют короткие пересекающиеся и вихреобразно расположенные пучки.

Проведено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование материала с антителами к Ki67 (Clone MIB-1; Dako, Дания; 1:100), виментину (Clone V9; Cell Marque, США; 1:200), панцитокератинам (Clone AE1/AE3; Cell Marque, США; 1:150), S-100 (Clone 4C4.9; Dako, Дания; ready-to-use), CD34 (Clone QBEnd10; Dako, Дания; 1:200), рецепторам к эстрогену (Clone

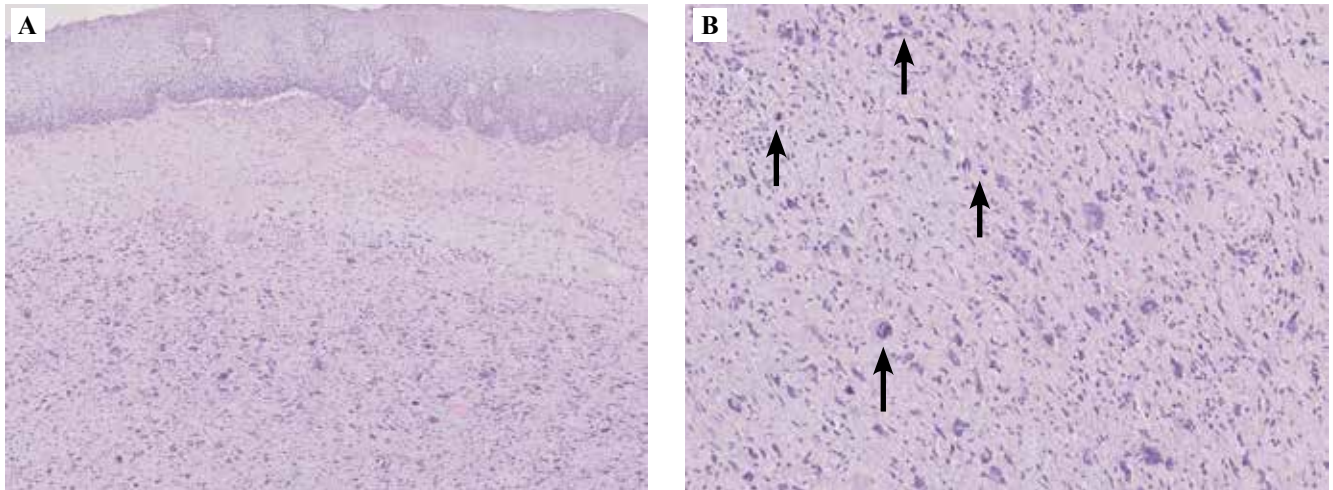


Рис. 1. Морфологическая картина фиброэпителиального стромального полипа вульвы.

А – образование покрыто многослойным плоским неороговевающим эпителием. В стромальном компоненте неравномерная клеточная плотность: на периферии – умеренный отек, немногочисленные фибробластоподобные клетки, в центральной (глубокой) зоне – высокая клеточность с явлениями ядерного полиморфизма. В – стромальные клетки причудливой формы с обильной бледно-базофильной цитоплазмой и эксцентрично расположенными полиморфными ядрами с грубым комковатым хроматином и картинами патологических митозов (до четырех в пределах одного поля зрения при $\times 400$) (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, А – $\times 100$, В – $\times 400$

Fig. 1. Morphologic picture view of a fibroepithelial stromal polyp of the vulva.

A – the mass is covered with multilayer squamous non-keratinizing epithelium. The stromal component has uneven cell density: edematous (on the periphery, with few fibroblast-like cells), high cellularity with signs of nuclear polymorphism (in the central (deep) zone). B – stromal cells of bizarre shape with abundant pale-basophilic cytoplasm and eccentrically located polymorphic nuclei with rough lumpy chromatin and patterns of pathological mitoses (up to 4/1 HPF) (arrows). H&E stain, A – $\times 100$, B – $\times 400$

SP1 Spring Bioscience Corp., США; 1:100), рецепторам к прогестерону (Clone 1E2; Cell Marque, США; 1:100), SMA (Clone 1A4; Spring Bioscience Corp., США; ready-to-use), десмину (Clone D3; Cell Marque, США; 1:200), CD10 (Clone SP67; Dako, Дания; 1:50).

В ядрах атипичных крупных клеток центральной зоны образования определялись слабая гетерогенная реакция на рецепторы эстрогена (рис. 2 А) и яркая выраженность реакции на рецепторы прогестерона (рис. 2 В). В клетках стромы выявлена интенсивная диффузная ИГХ реакция к виментину в цитоплазме и CD10 (рис. 2 С) на мембранах. CD34 демонстрировал неспецифическую реакцию в безъядерных волокнистых структурах между атипичными клетками. Уровень выраженности реакции к маркеру пролиферативной активности Ki-67 (рис. 2 D) был значительно выше в центральной гиперклеточной области образования (45–50%), чем на периферии стромальных клеточных скоплений (около 10%). ИГХ реакция на панцитокератин (AE1/AE3), SMA, десмин и S-100 в атипичных клетках была отрицательной.

С учетом данных анамнеза и клинических проявлений образования вульвы (возникновение и развитие поражения во второй половине беременности), а также представительства в атипичных стромальных клетках рецепторов к женским половым гормонам (эстрогенам, прогестерону) в протоколе прижизненного патолого-

анатомического исследования операционного материала мы сформулировали следующее заключение.

О99.8 (МКБ-10): фиброэпителиальный стромальный гиперклеточный полип вульвы в проекции кожи задней спайки на ножке $2,5 \times 2,0$ см, ассоциированный с беременностью 40 недель: наличие причудливых многоядерных стромальных клеток и картин патологических митозов, высокий уровень маркера Ki67 (экспрессия в ядрах 45–50% клеток с цитологическими чертами атипичии), выраженность реакции на рецепторы прогестерона и эстрогена в ядрах крупных атипичных клеток стромы.

Обсуждение

Природа ФСП вульвы и особенности его структуры вызывают интерес патологоанатомов с 1960-х годов в связи со сходством этого новообразования со злокачественными опухолями мезенхимального происхождения. Этиология ФСП сегодня остается не до конца ясной. Одни исследователи [9, 11] предполагают, что такие полипы происходят из грануляционной ткани после локальной альтерации (механическая травма, лучевая терапия, сахарный диабет 2-го типа, генитальный псориаз, врожденная лимфедема). Другие [6, 7] важным причинным фактором и модулятором роста вульвовагинальных полипов считают гормональные влияния. Некоторые авторы [1, 4] полагают, что стромальные

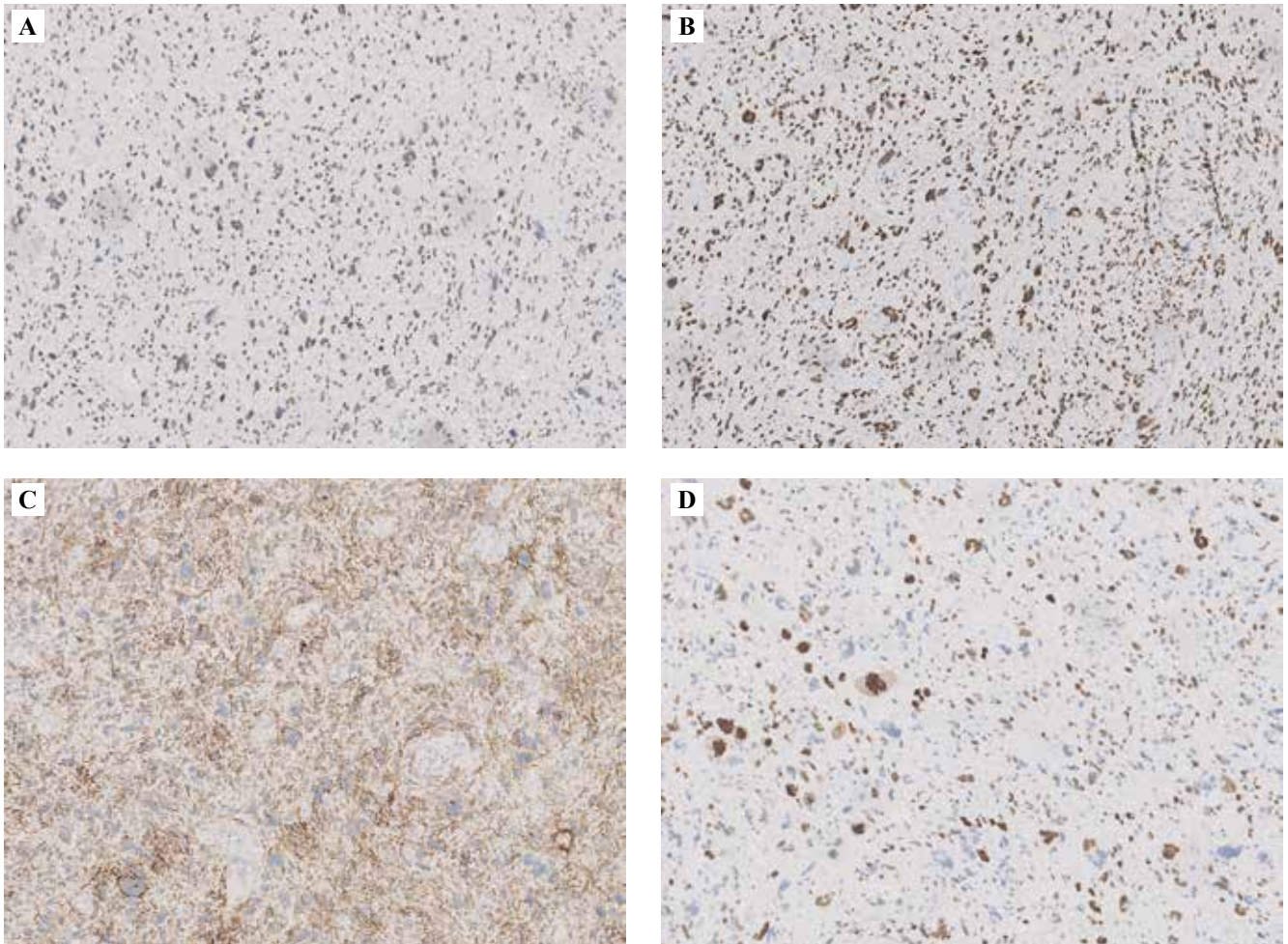


Рис. 2. Иммуноморфологическая картина фиброэпителиального стромального полипа вульвы. Выраженная ИГХ реакция в атипичных стромальных клетках на рецепторы к эстрогенам (А) и прогестерону (В); С – стромальные клетки иммунопозитивны к CD10; D – высокая пролиферативная активность стромальных клеток, маркер Ki67 экспрессируется в ядрах 45–50% атипичных клеток стромы. Иммуногистохимический метод, полимеразная тест-система, $\times 100$

Fig. 2. Immunomorphologic picture of a fibroepithelial stromal polyp of the vulva. Atypical stromal cells express receptors for estrogen (A) and progesterone (B); C – stromal cells are immunopositive for CD10; D – high proliferative activity of stromal cells, Ki67 marker is expressed in the nuclei of 45–50% of atypical stromal cells. IHC assay, polymerase test system, $\times 100$

клеточные элементы ФСП происходят из гормончувствительных мезенхимальных клеток или, возможно, из популяции примитивных стволовых клеток, локализованных у женщин в миксоидном субэпителиальном слое нижних отделов полового тракта [8]. Кроме того, ФСП вульвы наиболее часто возникает у пациенток репродуктивного возраста (в среднем 35 лет) [1], характеризуется быстрым ростом, как и в приведенном нами наблюдении (до 2,5 см в поперечнике менее чем за 18 недель гестации). Зачастую ФСП вульвы тесно коррелирует с гормональными сдвигами в женском организме (пубертатный период, беременность, прием тамоксифена, экзогенных прогестинов, заместительная гормональная терапия в постменопаузальном периоде), а также может спонтанно регрессировать после родов [5, 11].

Заключение

В литературе подчеркивается опасность ошибочной интерпретации псевдосаркоматоидных вульвовагинальных фиброэпителиальных стромальных полипов как злокачественных новообразований. При формулировании заключения в протоколе прижизненного патологоанатомического исследования операционного материала в представленном наблюдении мы остановились на доброкачественном характере поражения, поскольку основывались на факте появления и развития фиброэпителиального стромального полипа вульвы в период беременности, результатах иммуногистохимического исследования, демонстрирующих реакцию к маркерам рецепторов к женским половым гормонам в стромальных клетках, а также на современных данных литературы. Тем не менее мы полагаем, что не-

обходимо динамическое наблюдение за пациенткой с целью объективной оценки характера заживления, исключения местных признаков малигнизации в зоне хирургического вмешательства и своевременной диагностики рецидива, который изредка регистрируется при неполном удалении фиброэпителиального стромального полипа вульвы.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Л. Казачков, М.К. Лебедева, Д.В. Гоголева, Г.В. Сычугов, Э.А. Казачкова, Ю.А. Медведева, А.А. Дуб.

Сбор и обработка материала – М.К. Лебедева, Д.В. Гоголева.

Написание текста – Е.Л. Казачков, Ю.А. Медведева, А.А. Дуб.

Редактирование – Е.Л. Казачков, Э.А. Казачкова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.L. Kazachkov, M.K. Lebedeva, D.V. Gogoleva, G.V. Sychugov, E.A. Kazachkova, U.A. Medvedeva, A.A. Dub.

Collected the data and performed the analysis – M.K. Lebedeva, D.V. Gogoleva.

Wrote the paper – E.L. Kazachkov, U.A. Medvedeva, A.A. Dub.

Edited the manuscript – E.L. Kazachkov, E.A. Kazachkova.

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. Female genital tumours. V. 4. 5th ed. Lyon: IARC, 2020. 632 p.
2. Marini K, Garefis K, Skliris JP, Peltekis G, Astreinidou A, Florou V. Fibroepithelial polyp of palatine tonsil: a case report. Pan Afr Med J. 2021;39:276. DOI: 10.11604/pamj.2021.39.276.31057.
3. Ogura N, Inagaki M, Yasuda R, Yoshida S, Maeda T. A vaginal fibroepithelial stromal polyp: a case report with magnetic resonance images. BJR Case Rep. 2022;8(2):20210189. DOI: 10.1259/bjrcr.2021018.
4. Yoo J, Je BK, Yeom SK, Park YS, Min KJ, Lee JH. Giant fibroepithelial stromal polyp of the vulva: diffusion-weighted and conventional magnetic resonance imaging features and pathologic correlation. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2019;32(1):93–7. DOI: 10.1016/j.jpaa.2018.08.00.
5. Song JS, Song DE, Kim KR, Ro JY. Cellular pseudosarcomatous fibroepithelial stromal polyp of the vagina during pregnancy: a lesion that is overdiagnosed as a malignant tumor. Korean J Pathol. 2012;46(5):494–8. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2012.46.5.494.
6. Daneshpajooh A, Mirzaei M, Iranpour M. An unusual presentation of giant fibroepithelial polyp of the vagina. Iran J Pathol. 2021;16(4):456–60. DOI: 10.30699/IJP.2021.522689.2566.
7. Dura MC, Aktürk H, Sungur GŞ, Alsalam WOI. A giant fibroepithelial polyp of the vulva. Cureus. 2023;15(5):39152. DOI: 10.7759/cureus.39152.
8. Nucci MR, Young RH, Fletcher CD. Cellular pseudosarcomatous fibroepithelial stromal polyps of the lower female genital tract: an underrecognized lesion often misdiagnosed as sarcoma. Am J Surg Pathol. 2000;24(2):231–40. DOI: 10.1097/00000478-200002000-00009.
8. Chan MM, Yong TT, Sittampalam K. Giant labial fibroepithelial stromal polyp. Malays J Pathol. 2013;35(1):91–4. PMID: 23817400.
9. Lee MH, Hwang JY, Lee JH, Kim DH, Song SH. Fibroepithelial polyp of the vulva accompanied by lymphangioma circumscriptum. Obstet Gynecol Sci. 2017;60(4):401–4. DOI: 0.5468/ogs.2017.60.4.401.
10. Барينو И.В., Кондриков Н.И., Волощук И.Н. Патология вульвы и влагалища. Диагностические алгоритмы: Практическое руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 192 с.
- Barinova IV, Kondrikov NI, Voloshchuk IN. Pathology of the vulva and vagina. Diagnostic algorithms: Practical guide. Moscow: GEOTAR-Media, 2023. 192 p. (In Russ.).
11. Rexhepi M, Trajkovska E, Besimi F, Rufati N. Giant fibroepithelial polyp of vulva: a case report and review of literature. Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki). 2018;39(2-3):127–30. DOI: 10.2478/prilozi-2018-0051.

Информация об авторах

Евгений Леонидович Казачков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения № 2 ГБУЗ ЧОПАБ.

Марина Константиновна Лебедева – аспирантка кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения № 5 ГБУЗ ЧОПАБ.

Дарья Витальевна Гоголева – аспирантка кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, заведующая патологоанатомическим отделением № 5 ГБУЗ ЧОПАБ.

Глеб Вячеславович Сычугов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ ЧОПАБ.

Элла Алексеевна Казачкова – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии ЮУГМУ.

Юлия Алексеевна Медведева – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Анжела Алексеевна Дуб – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Author information

Evgeniy L. Kazachkov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University; Pathologist, Pathology Department No. 2, Chelyabinsk Regional Department of Pathology.
<https://orcid.org/0000-0002-2008-7671>

Marina K. Lebedeva – Postgraduate Student, V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University; Pathologist, Pathology Department No. 5, Chelyabinsk Regional Department of Pathology.
<https://orcid.org/0000-0002-5362-3549>

Darya V. Gogoleva – Postgraduate Student, V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University; Head of the Pathology Department No. 5, Chelyabinsk Regional Department of Pathology.
<https://orcid.org/0000-0001-5425-6472>

Gleb V. Sychugov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University; Deputy Chief Medical Officer, Chelyabinsk Regional Department of Pathology.
<https://orcid.org/0000-0003-3251-6944>

Ella A. Kazachkova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-1175-4479>

Uliia A. Medvedeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Associate Professor, Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University
<https://orcid.org/0009-0004-1088-9242>

Anzhela A. Dub – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-2007-3461>

XIV пленум Российского общества патологоанатомов

XIV Plenum of the Russian Society of Pathologists

24–25 мая 2024 года в Уфе проходил XIV пленум Российского общества патологоанатомов, в организации и проведении которого активно участвовали сотрудники НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского. В рамках пленума были рассмотрены вопросы участия патологоанатомической службы в реализации приоритетных направлений развития здравоохранения России, актуальные вопросы патологоанатомической практики, проблемы организации патологоанатомической службы. Обсуждены результаты деятельности рабочей группы Комитета по охране здоровья граждан Государственной думы Российской Федерации, касающиеся законодательных основ организации патологоанатомической службы, за-

дачи кадровой политики отрасли, вопросы актуализации приказов Минздрава России о патологоанатомических исследованиях. С докладом, посвященным созданию первого в нашей стране референс-центра инфекционной и вирусной онкопатологии в системе Минобрнауки России, выступила директор НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына член-корреспондент РАН Л.М. Михалева. Научный руководитель НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына член-корреспондент РАН Л.В. Кактурский осветил современные тренды морфологического изучения патологии сердца. С докладами по актуальным вопросам патологической анатомии выступили сотрудники института А.Е. Бирюков, К.Ю. Мидибер, М.В. Мнихович, аспиранты института А.А. Тебенькова, Н.А. Гутырчик.



Научно-познавательный фестиваль «МЕДИКФЕСТ»

Scientific and educational festival “MEDIKFEST”

15 июня 2024 года в Москве в культурно-просветительском центре «Зарядье» прошел научно-познавательный фестиваль «МЕДИКФЕСТ», организованный Российским научным центром хирургии имени академика Б.В. Петровского. В мероприятии активное участие приняли сотрудники НИИ морфологии человека Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского А.П. Авцына. Фестиваль был приурочен ко Дню медицинского работника. В рамках «МЕДИКФЕСТа» ученые и врачи проводили просветительские мероприятия по профессиональной ориентации школьников и абитуриентов, проявивших интерес к медицине. Ведущие специалисты центра и института рассказали о новейших технологиях в области медицины, достижениях современной хирургии, перспективных направлениях в нормальной и патологической анатомии и гистологии человека. Учащиеся прослушали лекции крупных ученых о разных областях медицины, а с помощью представленных стендов, тренажеров, музейных препаратов и микроскопов ближе познакомились с работой врачей.