

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 14 | № 5 | 2025

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

**«Клиническая
и экспериментальная
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность: 6 раз 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

Грушецкая Е.О.

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. Авцина
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

Зайратьяниц 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

Асатурова А.В., доктор мед. наук,
Москва, Россия

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

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

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

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

Коришунов 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

Толибова Г.Х., доктор мед. наук,
Санкт-Петербург, 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 14 | No 5 | 2025

ISSN 2226-5988

eISSN 2686-6749

“Clinical
and experimental
morphology”

SCIENTIFIC AND PRACTICAL
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 6 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 Grushetskaya E.O.

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

Asaturova, Aleksandra V., Dr. Sci. Med.,
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

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

Tolibova, Gulruksor Kh., Dr. Sci. Med.,
Saint Petersburg, Russia

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

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

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

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

Only articles prepared in accordance with the requirements of the editorial board are accepted for publication.
The authors' points 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

А.Д. Колина, Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева
Потенциальные прогностические маркеры
аденокарцином и аденоплоскоклеточного рака
шейки матки

5

A.D. Kolina, N.V. Danilova, Yu.Yu. Andreeva
Potential prognostic markers of adenocarcinomas
and adenosquamous carcinoma of the cervix

Л.М. Сомова, С.А. Абрамова, И.Н. Ляпун,
Е.И. Дробот, М.Ю. Щелканов
Миграция нейтрофилов при воспалении
и инфекции: современные данные и роль
в формировании нейтрофильных фенотипов

14

L.M. Somova, S.A. Abramova, I.N. Lyapun,
E.I. Drobot, M.Yu. Shchelkanov
Neutrophil migration in inflammation and infection:
role in the formation of neutrophilic phenotypes

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH

В.С. Чирский, Е.А. Андреева, Н.А. Наливкина,
В.С. Сидорин
Центрлобулярные некрозы печени при сепсисе

22

V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, N.A. Nalivkina,
V.S. Sidorin
Centrilobular liver necrosis in sepsis

К.С. Масленкина, Л.М. Михалева, М.С. Наumenко,
М.Ю. Гуцин, В.В. Печникова, А.С. Конторищиков,
К.Ю. Мидибер, А.Е. Бирюков
Иммуногистохимические предикторы
аденокарциномы и плоскоклеточного рака
пищевода

30

K.S. Maslenkina, L.M. Mikhaleva, M.S. Naumenko,
M.Yu. Gushchin, V.V. Pechnikova, A.S. Kontorshchikov,
K.Yu. Midiber, A.E. Birukov
Immunohistochemical predictors of adenocarcinoma
and squamous cell carcinoma of the esophagus

К.Ш. Балабанова, Н.А. Махукова, Г.С. Дзюба,
Ф.Ф. Бурумкулова, К.В. Краснополянская,
И.В. Баринова, Р.Г. Шмаков, Т.С. Коваленко
Морфофункциональные особенности плаценты
пациентов с гестационным сахарным диабетом
после экстракорпорального оплодотворения

39

K.Sh. Balabanova, N.A. Makhukova, G.S. Dziuba,
F.F. Burumkulova, K.V. Krasnopol'skaya, I.V. Barinova,
R.G. Shmakov, T.S. Kovalenko
Structural and functional features of placentas
in patients with gestational diabetes mellitus after
in vitro fertilization

*Е.Е. Ворopaева, Э.А. Казачкова, Л.С. Ищенко,
Е.Л. Казачков, А.Ю. Холопова, Т.Н. Шамаева*
Плацентарные повреждения при доношенной
беременности у реконвалесцентов, перенесших
COVID-19 в разные trimestры гестации

49 *E.E. Voropaeva, E.A. Kazachkova, L.S. Ishchenko,
E.L. Kazachkov, A.Yu. Kholopova, T.N. Shamaeva*
Placental damage in preterm pregnancy in COVID-19
survivors in different trimesters of gestation

М.В. Малышева, Л.В. Кулида, Е.В. Проценко
Морфофункциональные особенности миокарда
глубоконеодошенных новорожденных,
перенесших хроническую внутриутробную
гипоксию

60 *M.V. Malysheva, L.V. Kulida, E.V. Procenko*
Morphological and functional features
of the myocardium of extremely premature newborns
with chronic intrauterine hypoxia

*O.S. Godovalova, A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova,
Yu.S. Krivova, S.V. Saveliev*
Comparative analysis of cortical maturation in sulci
and gyri of the visual cortex during human late
prenatal and postnatal periods

69 *O.C. Годовалова, А.Е. Прошина, А.С. Харламова,
Ю.С. Кривова, С.В. Савельев*
Сравнительный анализ созревания
борозд и извилин зрительной коры
в поздний пренатальный и постнатальный период
развития человека

МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

С.В. Буравков
Применение программы ImageJ для картирования
химических элементов методом рентгеновского
микроанализа на сканирующем электронном
микроскопе

78 *S.V. Buravkov*
ImageJ software for elemental mapping using X-ray
microanalysis on a scanning electron microscope

Потенциальные прогностические маркеры аденокарцином и аденоплоскоклеточного рака шейки матки

А.Д. Колина^{1,2}, Н.В. Данилова^{1,2,3}, Ю.Ю. Андреева⁴

¹ Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Университетская клиника Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Аденокарцинома и аденоплоскоклеточный рак шейки матки в совокупности составляют до 20% всех случаев рака указанной локализации. Они представляют собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся по клиническому течению, факторам риска, морфологическим особенностям, ответу на лечение и прогнозу. Целью исследования был систематический анализ данных литературы о потенциальных предикторах этих гистологических подтипов рака шейки матки, включая маркеры раковых стволовых клеток CD44 и CD10, а также маркер желудочной/кишечной дифференцировки MUC5AC, которые могут помочь в стратификации риска у пациенток с указанными опухолями. Проведен поиск литературы на английском языке с использованием электронных баз данных PubMed и Web of Science. Также были проанализированы ссылки из найденных исследований. Отбирались статьи, опубликованные с января 1995 года по декабрь 2024 года. В соответствии с критериями включения и исключения из 284 публикаций были отобраны 29 исследований (24 исследования типа случай–контроль и пять когортных). В результате анализа источников сделан вывод, что маркеры CD44 и CD10 являются предикторами негативного прогноза при плоскоклеточном раке шейки матки, при этом информация о прогностической значимости данных белков при неплоскоклеточных карциномах шейки матки крайне ограничена и требует дальнейшего изучения. Что касается маркера MUC5AC, показана его связь со степенью дифференцировки аденокарцином шейки матки, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального косвенного предиктора при данных опухолях.

Ключевые слова: рак шейки матки, прогноз, CD44, CD10, MUC5AC, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Арина Дмитриевна Колина. E-mail: arina.zaharkina@mail.ru

Для цитирования: Колина А.Д., Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю. Потенциальные прогностические маркеры аденокарцином и аденоплоскоклеточного рака шейки матки. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):5–13. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.5-13.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 29.05.2025. Получена после рецензирования 18.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

Potential prognostic markers of adenocarcinomas and adenosquamous carcinoma of the cervix

A.D. Kolina^{1,2}, N.V. Danilova^{1,2,3}, Yu.Yu. Andreeva⁴

¹ Faculty of Fundamental Medicine of Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² University Clinic of Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

⁴ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract. Adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix account for up to 20% of all cervical cancers. These subtypes represent a heterogeneous group of tumors that differ in clinical course, risk factors, morphology, treatment response, and prognosis. This study aimed to systematically review the literature on

potential prognostic predictors of these histological subtypes of cervical cancer, including cancer stem cell markers CD44 and CD10 and gastric/intestinal differentiation marker MUC5AC, which may help in risk stratification in affected patients. We searched PubMed and Web of Science databases for English-language publications from January 1995 to December 2024 and screened references from relevant studies. Out of 284 papers, we selected 29 studies (24 case-control studies and 5 cohort studies) according to inclusion and exclusion criteria. The analysis showed that CD44 and CD10 markers are negative prognostic predictors of squamous cell carcinoma of the cervix; however, evidence on their prognostic value in non-squamous carcinomas of the cervix is scarce and requires further study. MUC5AC expression correlated with the degree of differentiation in cervical adenocarcinomas, which suggests its potential role as an indirect prognostic predictor in these tumors.

Keywords: cervical cancer, prognosis, CD44, CD10, MUC5AC, immunohistochemistry

Corresponding author: Arina D. Kolina. E-mail: arina.zaharkina@mail.ru

For citation: Kolina A.D., Danilova N.V., Andreeva Yu.Yu. Potential prognostic markers of adenocarcinomas and adenosquamous carcinoma of the cervix. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):5–13 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.5-13.

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

Received 29.05.2025. **Received in revised form** 18.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

За последние 40 лет заболеваемость раком шейки матки (РШМ) снизилась более чем на 40% благодаря широкому внедрению цитологического скрининга [1]. Тем не менее абсолютная частота аденокарциномы и аденоплоскоклеточного РШМ и их относительная частота по сравнению с плоскоклеточным раком (ПКР) РШМ возросли: в настоящее время на долю аденокарциномы и аденоплоскоклеточного РШМ в совокупности приходится около 20% всех диагнозов «рак шейки матки», что значительно выше, чем 5–10%, наблюдавшихся в 1970-х годах [1, 2]. В ряде исследований показано, что аденокарцинома и аденоплоскоклеточный РШМ имеют худший прогноз в сравнении с ПКР шейки матки [3–5]. Значительное число случаев аденокарциномы и аденоплоскоклеточного РШМ регистрируется на поздних стадиях, когда 5-летняя выживаемость составляет менее 20% [6]. Кроме того, аденокарцинома и аденоплоскоклеточный РШМ представляют собой гетерогенную группу опухолей, различающихся по эпидемиологическим, морфологическим и прогностическим характеристикам, чем обусловлена необходимость поиска новых перспективных предикторов для своевременной стратификации риска у пациенток с этими опухолями. Целью настоящего исследования был систематический обзор данных литературы, касающихся потенциальных прогностических параметров РШМ: маркеров раковых стволовых клеток, включая CD44 и CD10, а также маркера желудочной/кишечной дифференцировки MUC5AC.

Отбор исследований

Проведен поиск литературы на английском языке с использованием электронных баз данных PubMed и Web of Science. Наряду с этим были проанализированы ссылки из найденных исследований. Отбирались статьи, опубликованные с января 1995 года по декабрь

2024 года, в соответствии со следующими критериями включения.

- Исследование должно относиться к типам обзор, случай–контроль или когортное.
- Исследование должно содержать данные о маркерах раковых стволовых клеток CD44 и CD10, а также маркере желудочной/кишечной дифференцировки MUC5AC.
- Исследование должно включать пациенток с подтвержденным диагнозом «рак шейки матки» любой стадии с гистологическим типом «плоскоклеточный рак», «аденокарцинома» или «аденоплоскоклеточный рак».
- Исследование должно включать анализ связи маркеров CD44, CD10 и MUC5AC с клинико-морфологическими параметрами опухоли и прогнозом у пациенток с РШМ.
- Исследование должно содержать результаты иммуногистохимического анализа маркеров CD44, CD10 и MUC5AC, выполненного на образцах парафиновых блоков РШМ.

Критерии исключения: анализ цитологических образцов РШМ, описания клинических случаев, рефераты, материалы конференций и докладов.

В соответствии с критериями включения и исключения из 284 публикаций были отобраны 29 исследований (24 исследования типа случай–контроль и пять когортных).

Прогностическая значимость маркера опухолевых стволовых клеток CD44 при раке шейки матки

CD44 является трансмембранным гликопротеином клеточной поверхности и участвует в клеточной адгезии, выступая в качестве рецептора для компонентов внеклеточного матрикса, таких как гиалуроновая кислота, фибронектин, коллаген и остеопонтин [7].

Сигнальные пути, активируемые CD44, представлены на рисунке 1 [8]. Посредством влияния на ключевые нижележащие сигнальные каскады, включая PI3K/AKT и MAPK/ERK, CD44 регулирует процессы пролиферации и инвазии опухолевых клеток [8].

Кроме того, белок CD44 является маркером раковых стволовых клеток (РСК) – небольшой субпопуляции опухолевых клеток, обладающих способностью к плюрипотентности, дифференцировке в различные типы клеток и самообновлению. Роль РСК в канцерогенезе РШМ продолжает изучаться, и на сегодняшний день CD44 выступает одним из ключевых маркеров РСК при данной онкопатологии [9, 10]. В многочисленных исследованиях рассматривалась экспрессия разных изоформ белка CD44 при ряде онкологических заболеваний: показано, что CD44 влияет на способность опухоли к инвазии, прогрессии и метастазированию [11, 12].

Что касается РШМ, в упомянутом выше исследовании S. Suwihat et al. [11] положительное иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание с антителом к белку CD44v6 встречалось в 57,7% случаев (30/52) во всей когорте пациенток с РШМ. При этом положительное окрашивание с антителом к CD44v6 отмечено в 85,7% случаев (24/28) при ПКР и в 25% случаев (6/24) при аденокарциноме шейки матки. Таким образом, частота положительного ИГХ окрашивания с антителом к белку CD44v6 была выше среди ПКР в сравнении с аде-

нокарциномой шейки матки ($p < 0,001$), что согласуется с данными более ранних работ [13, 14]. Кроме того, наблюдалась значимая связь между CD44-статусом и наибольшим размером опухоли ($p = 0,03$), однако взаимосвязи с такими параметрами как возраст, стадия по классификации FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics, Международная федерация гинекологии и акушерства), наличие опухолевых эмболов в лимфатических сосудах, наличие метастазов в тазовых лимфатических узлах не выявлено. Анализ общей выживаемости пациенток также не выявил значимых отличий в зависимости от CD44-статуса опухоли. Напротив, в недавнем систематическом обзоре с метаанализом M.N. Fahmi et al. показано, что высокая интенсивность ИГХ окрашивания с антителом к белку CD44 ассоциировалась с более низкой общей выживаемостью пациенток при РШМ [15]. В другом исследовании, включавшем 40 образцов, полученных от пациенток с РШМ, была установлена связь положительного ИГХ окрашивания с антителом к белку CD44v6 с плохим прогнозом у пациенток с РШМ на III стадии по FIGO [16]. Более того, рядом авторов положительный CD44-статус охарактеризован как независимый прогностический параметр при РШМ на ранних стадиях [17]. Согласно данным, полученным M.Y. Weng et al. при исследовании 30 образцов от пациенток с РШМ, наличие положительного ИГХ окрашивания с антителом к белку CD44v6 было ассоциировано с присутствием региональных и отдаленных метастазов и с поздними стадиями РШМ ($p < 0,05$), при этом корреляция с возрастом пациенток, наибольшим размером опухоли, степенью дифференцировки и гистологическим типом РШМ не выявлена [18]. Таким образом, результаты, полученные при изучении прогностической роли белка CD44 при РШМ, противоречивы, что может быть обусловлено отличиями в размере выборок. Однако, согласно данным большинства исследователей, белок CD44 может рассматриваться в качестве косвенного маркера неблагоприятного прогноза при РШМ. Необходимо отметить, что подавляющее число работ посвящено изучению роли РСК при ПКР шейки матки, при этом в научной литературе имеются единичные работы, исследующие роль РСК при неплоскоклеточных карциномах шейки матки.

Еще одной крайне актуальной проблемой является резистентность пациенток с аденокарциномой и аденоплоскоклеточным РШМ к стандартной химиотерапии. Устойчивость к используемым в настоящее время стратегиям лечения связывают с РСК, которые считаются одной из возможных причин неудовлетворительных результатов лечения РШМ и других злокачественных опухолей [19–21]. Установлено, что РСК не только обладают потенциалом к опухолеобразованию, но также проявляют устойчивость к цитотоксическим препаратам и ионизирующему излучению, в том числе при опухолях женской половой системы [22]. В работе H. Lui et al. CD44+/CD24+-экспрессирующие клетки

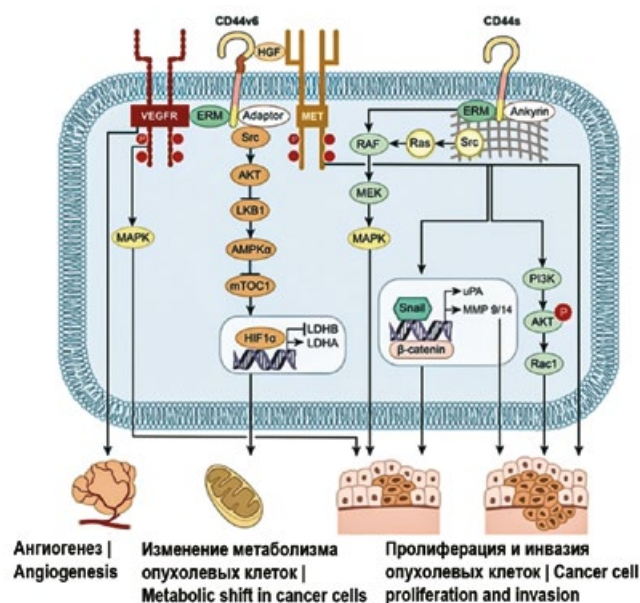


Рис. 1. Сигнальные пути, опосредованные CD44. Адаптировано из: Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol Oncol [8]

Fig. 1. CD44-mediated downstream signaling pathways. Adapted from: Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol Oncol [8]

РШМ проявляли устойчивость к облучению и демонстрировали свойства РСК [10]. Таким образом, CD44-статус может быть ценным прогностическим маркером резистентности к лучевой терапии при РШМ. Понимание основных механизмов, благодаря которым РСК способствуют устойчивости к химио- и лучевой терапии, позволит разработать более эффективные методы лечения для улучшения клинических исходов у пациенток с РШМ. Так, известно, что к механизмам резистентности, обусловленным РСК шейки матки, относятся способность к неограниченному делению, перепрограммирование клеток опухолевого микроокружения (включая опухоль-ассоциированные фибробласты и опухоль-ассоциированные макрофаги), влияние на сигнальные пути, опосредованные белками Wnt и Notch, эпигенетические механизмы (метилирование ДНК и др.), индукция эпителиально-мезенхимального перехода, активация неоангиогенеза [23]. Механизмы стволовых клеток РШМ, способствующие терапевтической устойчивости, схематически представлены на рисунке 2 [23]. В данном контексте особенно актуальными являются работы, посвященные поиску потенциальных таргетных препаратов, направленных на элиминацию РСК при опухолях женской половой системы [24, 25].

Малоизученным остается вопрос взаимосвязи РСК с иммунотерапевтическими маркерами, такими как микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) и положительное ИГХ окрашивание

с антителом к лиганду рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death ligand 1, PD-L1). Результаты многочисленных исследований показывают, что сложные механизмы взаимодействия между РСК и иммунным микроокружением играют значимую роль в возникновении, росте и метастазировании опухоли [26]. РСК способствуют перепрограммированию иммунных клеток в сторону проопухолевых фенотипов, в свою очередь, перепрограммированные иммунные клетки способствуют увеличению субпопуляции РСК и их стволовых способностей, таких как миграция клеток, клоногенность, устойчивость к лечению [27]. В недавнем исследовании 2023 года CD44+ статус был ассоциирован с мутационной нагрузкой опухоли и MSI-статусом в 10 и шести типах злокачественных новообразований, соответственно, что указывает на возможность использования данного маркера в качестве потенциального предиктора ответа на иммунотерапию [28].

Таким образом, исследование РСК может стать важным направлением в разработке терапевтических подходов при многих онкологических заболеваниях, включая РШМ, ввиду их значимой роли в канцерогенезе. Дальнейшее изучение РСК может открыть новые возможности для преодоления терапевтической резистентности при РШМ, что особенно важно для прогностически неблагоприятных гистологических подтипов РШМ, таких как аденокарцинома и аденоплоскоклеточный рак. Белок CD44 является предиктором

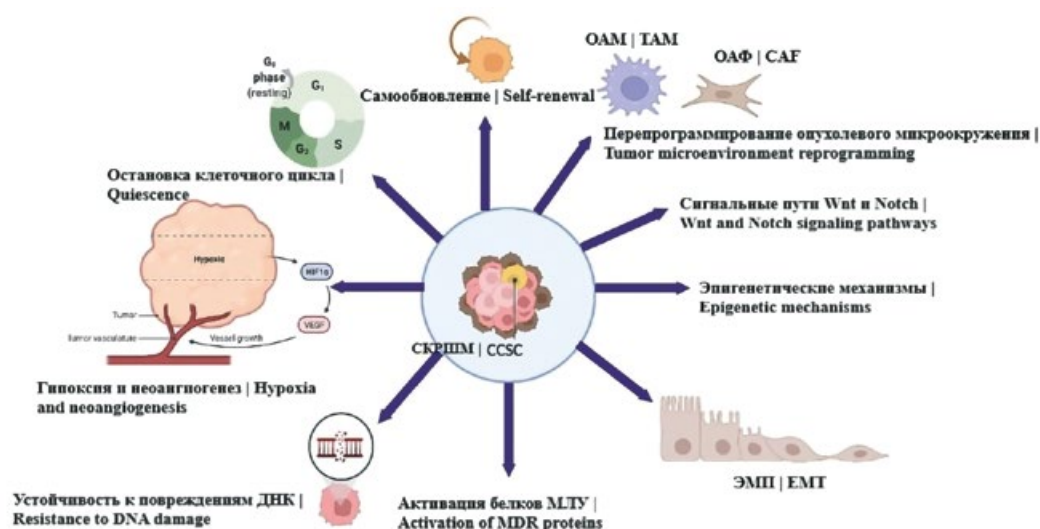


Рис. 2. Механизмы стволовых клеток рака шейки матки, способствующие химиорезистентности.

СКРШМ – стволовые клетки рака шейки матки; ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги; ОАФ – опухоль-ассоциированные фибробласты; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; МДР – множественная лекарственная устойчивость. Адаптировано из: Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Pentimalli F, Giordano A et al. Cancer stem cells and their possible implications in cervical cancer: a short review. Int J Mol Sci [23]

Fig. 2. Mechanisms of cervical cancer stem cells contributing to chemoresistance.

CCSC – cervical cancer stem cells; TAM – tumor-associated macrophages; CAF – cancer-associated fibroblasts; EMT – epithelial-mesenchymal transition; MDR – multidrug resistance. Adapted from: Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Pentimalli F, Giordano A et al. Cancer stem cells and their possible implications in cervical cancer: a short review. Int J Mol Sci [23]

неблагоприятного прогноза при стратификации риска у пациенток с ПКР шейки матки, однако его прогностическая значимость при неплоскоклеточных карциномах шейки матки требует дальнейшего изучения.

Биологическая роль маркера CD10 при раке шейки матки

Белок CD10, также известный как нейтральная эндопептидаза или неприлизин (neprilysin, NEP), – это цинк-зависимая мембраносвязанная эндопептидаза, представленная в организме в трансмембранной и растворимой формах. Являясь эктоферментом, CD10 способствует протеолитическому расщеплению различных субстратов и тем самым модулирует биологическую активность и доступность ряда пептидов, включая бомбезин, брадикинин и другие [29]. В некоторых работах была продемонстрирована связь между CD10+ окрашиванием и прогрессированием солидных опухолей [30, 31]. При этом точные механизмы влияния белка CD10 на прогрессию опухоли неясны. Некоторые авторы предполагают, что действие белка CD10 опосредовано деградацией внеклеточного матрикса и модуляцией внутриклеточных сигнальных путей [32], в то время как другие утверждают, что высокая интенсивность ИГХ окрашивания с антителом к белку CD10 является независимым фактором негативного прогноза при ряде онкологических заболеваний [33, 34]. Напротив, ряд исследований свидетельствует о снижении функциональной активности белка CD10, например при раке легкого и раке простаты [35]. Таким образом, данные о биологической роли белка CD10 в канцерогенезе противоречивы.

Необходимо подчеркнуть, что наличие CD10+ реакции, выявляемое в паренхиме и в строме опухоли, имеет разное клиническое значение. Так, наличие мембранно-цитоплазматического ИГХ окрашивания в клетках РШМ является ключевым прогностическим показателем [36]. При этом для рака молочной железы и ряда других онкологических заболеваний именно положительное окрашивание в клетках стромы опухоли является фактором негативного прогноза [37, 38].

Согласно немногочисленным исследованиям, CD10-реакция в клетках РШМ связана с повышенным риском опухолевой прогрессии [37]. Напротив, при раке молочной железы, раке желудка и колоректальном раке наблюдается обратная зависимость: высокая интенсивность ИГХ окрашивания с антителом к белку CD10 ассоциирована с плохим прогнозом [36, 39]. Таким образом, тканеспецифичная прогностическая двойственность подчеркивает необходимость изучения биологической роли CD10 в контексте конкретной патологии.

Важно отметить, что в норме плоский и железистый эпителий шейки матки характеризуются CD10-реакцией, что делает его обнаружение в образцах опухоли особенно важным [40].

Отдельно необходимо выделить роль белка CD10 в возникновении терапевтической устойчивости опу-

холей. Так, в ряде исследований выявлена связь между CD10+ статусом и химиорезистентностью при меланоме [41], ПКР головы и шеи [42], колоректальном раке [43]. При этом на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению биологической роли белка CD10 в химиорезистентности РШМ. Рядом авторов обнаружено, что повышенная функциональная активность белка CD10 влияет на регуляцию экспрессии генов, включая *CD44*, *ALDH1*, *BM1*, *NANOG*, *OCT4* и *SOX2*, которые модулируют биологическую активность РСК [44]. Так, при ПКР полости рта положительный CD10-статус опухоли связан с возникновением РСК-подобных признаков опухолевых клеток и усилением таких важнейших для прогрессии опухоли способностей, как миграция клеток, инвазия, сфероидогенез и устойчивость к химиотерапии. В работе Y. Wang et al. замечено, что клетки ПКР полости рта, характеризующиеся высокой интенсивностью ИГХ окрашивания с антителом к белку CD10, также демонстрируют положительную экспрессию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, включая N-кадгерин и виментин, при этом в опухолевых клетках наблюдался низкий уровень ИГХ окрашивания с антителом к E-кадгерину, который участвует в образовании плотных контактов между эпителиоцитами [44]. Кроме того, авторами работы замечено, что исследуемые опухолевые клетки проявляли устойчивость к цисплатину.

Как было упомянуто ранее, исследования, посвященные изучению связи белка CD10 с терапевтической устойчивостью РШМ, отсутствуют. Тем не менее данные относительно других злокачественных опухолей могут позволить выявить механизмы, участвующие в резистентности РШМ к существующим методам лечения. На сегодняшний день описаны следующие механизмы: модуляция экспрессии антиапоптозных генов (наблюдается при меланоме) [41]; ферментативная деградация химиотерапевтических агентов и индукция экспрессии генов, ответственных за возникновение фенотипа РСК, включая *OCT3/4* и т.д. (наблюдается при ПКР головы и шеи) [45]. Принимая во внимание тканеспецифичную биологию и функции белка CD10, его прогностическая значимость при аденокарциноме и аденоплоскоклеточном раке шейки матки, а также роль в возникновении терапевтической устойчивости РШМ требуют уточнения при исследовании на репрезентативной выборке пациенток.

Маркер желудочной/кишечной дифференцировки MUC5AC: прогностический потенциал при раке шейки матки

Муцины – это семейство гликопротеинов, экспрессирующихся на поверхности эпителиальных клеток, включая протоки слезных и слюнных желез, выстилку респираторного, желудочно-кишечного, уротелиального и репродуктивного тракта [46]. MUC5AC относится к гелеобразующим муцинам и экспресси-

руется в конъюнктиве, среднем ухе, носоглотке, легких, желчном пузыре и желудке, где он обеспечивает защиту эпителия от повреждающих факторов [47]. MUC5AC+ окрашивание было выявлено в нормальном эндоцервикальном эпителии, а также при дольковой эндоцервикальной glandулярной гиперплазии (Lobular endocervical glandular hyperplasia, LEGH), LEGH с атипией и ВПЧ-неассоциированной эндоцервикальной аденокарциномой желудочного типа (GAC) [48]. GAC включает аденокарциному с минимальными изменениями (Minimal deviation adenocarcinoma, MDA), высокодифференцированную GAC (GAC-MDA, ранее известную как злокачественная аденома), а также умеренно и низкодифференцированные варианты ВПЧ-неассоциированной эндоцервикальной аденокарциномы желудочного типа (GAC-nonMDA). Полученные результаты позволили предполагать, что MUC5AC+ окрашивание может наблюдаться и в иных гистологических подтипах аденокарцином шейки матки, что позднее было обнаружено в другой работе [49]. Авторы исследовали 101 образец ПКР шейки матки и 108 образцов аденокарцином шейки матки и установили, что частота MUC5AC+ окрашивания составила 81,48% среди аденокарцином шейки матки и 9,9% среди ПКР шейки матки [49]. Кроме того, в том же исследовании была проанализирована связь между MUC5AC+ реакцией и клинико-морфологическими характеристиками аденокарцином шейки матки, а также статусом общей выживаемости пациенток. Согласно полученным результатам, отрицательная ИГХ реакция с антителом к белку MUC5AC ассоциировалась с низкой степенью дифференцировки опухоли ($p=0,036$), при этом связи с такими параметрами как возраст, наибольший размер опухоли, глубина инвазии и наличие метастазов в лимфатических узлах выявлено не было ($p>0,05$). Анализ общей выживаемости пациенток также не выявил зависимости между MUC5AC-статусом и прогнозом при аденокарциноме шейки матки ($p>0,05$). Что касается связи с гистологическим подтипом аденокарциномы, MUC5AC+ окрашивание наблюдалось в 100% случаев при муцинозной аденокарциноме кишечного типа, 66,67% случаев при вилоклеточной аденокарциноме, 75% случаев при эндометриальной аденокарциноме, 100% случаев при светлоклеточной аденокарциноме, 100% случаев при серозной аденокарциноме, 50% случаев при аденоплоскоклеточном раке и 100% случаев при инвазивной многослойной муцинозной аденокарциноме. Таким образом, частота MUC5AC+ окрашивания не имела статистических различий между гистологическими подтипами аденокарцином шейки матки ($p>0,05$) [49].

Интересные данные получены в немногочисленных исследованиях, касающихся общности молекулярных механизмов возникновения GAC и аденокарцином панкреатобилиарного типа. В ряде работ продемонстрировано, что эти опухоли проявляют морфологическое и иммунофенотипическое сходство [50]. Принимая во

внимание имеющиеся данные о том, что MUC5AC является перспективным прогностическим маркером при раке поджелудочной железы [51], представляет интерес изучение биологической роли белка MUC5AC при аденокарциномах шейки матки.

Таким образом, прогностическая значимость белка MUC5AC продемонстрирована для некоторых онкологических заболеваний, например для рака поджелудочной железы. При этом в литературе имеются немногочисленные работы, демонстрирующие связь белка MUC5AC со степенью дифференцировки аденокарцином шейки матки, однако отсутствие взаимосвязи с другими клинико-морфологическими параметрами опухоли может быть обусловлено недостаточным размером выборки.

Заключение

Важной задачей современной медицины является поиск предикторов для своевременной стратификации риска у пациенток с аденокарциномой и аденоплоскоклеточным раком шейки матки, представляющими собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся по прогностическим особенностям. В настоящее время большинство исследований, посвященных прогностической роли маркеров раковых стволовых клеток CD44 и CD10, проводится при плоскоклеточном раке шейки матки: показана их связь с неблагоприятным прогнозом при данном гистологическом подтипе. При этом для неплоскоклеточных карцином шейки матки данные крайне ограничены, что затрудняет их клиническое применение и обуславливает необходимость дальнейшего изучения прогностического потенциала белков CD44 и CD10 среди пациенток с этими опухолями. Имеются немногочисленные работы, демонстрирующие связь белка MUC5AC со степенью дифференцировки аденокарцином шейки матки, что позволяет рассматривать этот маркер в качестве потенциального косвенного предиктора при обозначенных новообразованиях.

Ограничения исследования

К ограничениям исследования относится недостаточный объем информации по прогностической значимости маркеров CD44, CD10 и MUC5AC при аденоплоскоклеточном раке шейки матки в связи с низкой частотой встречаемости данного гистологического подтипа.

Study limitations

The main limitation of this study is insufficient amount of data on the prognostic significance of the CD44, CD10, and MUC5AC markers in adenosquamous carcinoma of the cervix, due to the low incidence of this histological subtype.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in-

- cidence trends among white women and black women in the United States for 1976–2000. *Cancer*. 2004;100(5):1035–44. DOI: 10.1002/cncr.20064.
2. Bray F, Carstensen B, Möller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(9):2191–9. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0231.
3. Galic V, Herzog TJ, Lewin SN, Neugut AI, Burke WM, Lu YS et al. Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;125(2):287–91. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.01.012.
4. Fujiwara K, Monk B, Devouassoux-Shisheboran M. Adenocarcinoma of the uterine cervix: why is it different? *Curr Oncol Rep*. 2014;16(12):416. DOI: 10.1007/s11912-014-0416-y.
5. Mabuchi S, Okazawa M, Matsuo K, Kawano M, Suzuki O, Miyatake T et al. Impact of histological subtype on survival of patients with surgically-treated stage IA2–IIB cervical cancer: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012;127(1):114–20. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.06.021.
6. Giannella L, Di Giuseppe J, Delli Carpini G, Grelloni C, Fichera M, Sartini G et al. HPV-negative adenocarcinomas of the uterine cervix: from molecular characterization to clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2022;23:15022. DOI: 10.3390/ijms232315022.
7. Weng X, Maxwell-Warburton S, Hasib A, Ma L, Kang L. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2022;33(5):318–32. DOI: 10.1016/j.tem.2022.02.002.
8. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):64. DOI: 10.1186/s13045-018-0605-5.
9. Jagupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:708036. DOI: 10.1155/2012/708036.
10. Liu H, Wang YJ, Bian L, Fang ZH, Zhang QY, Cheng JX. CD44+/CD24+ cervical cancer cells resist radiotherapy and exhibit properties of cancer stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(9):1745–54. PMID: 27212166.
11. Suwiwat S, Tungsinmunlong K, Siriaungkul S. Expression of CD44v6 and RCAS1 in uterine cervical carcinoma infected with human papillomavirus and its effect on cell proliferation and differentiation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(7):2431–9. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.7.2431.
12. Soleimani A, Saeedi N, Al-Asady AM, Nazari E, Hanaie R, Khazaei M et al. Colorectal cancer stem cell biomarkers: biological traits and prognostic insights. *Curr Pharm Des*. 2024;30(18):1386–97. DOI: 10.2174/0113816128291321240329050945.
13. Bouda J, Boudova L, Hes O, Havir M, Tempfer C, Kohlberger P et al. CD44v6 as a prognostic factor in cervical carcinoma FIGO stage IB. *Anticancer Res*. 2005;25(1B):617–22. PMID: 15816636.
14. Tokumo K, Kodama J, Seki N, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T. CD44 exon v6 correlates with cellular differentiation but not with progression and metastasis of cervical cancer. *Eur J Cancer*. 1998;34(13):2107–11. DOI: 10.1016/s0959-8049(98)00246-9.
15. Fahmi MN, Hertapannidika IN, Kusuma F. The prognostic value of cancer stem cell markers in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(12):4057–65. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.12.4057.
16. Kainz C, Kohlberger P, Tempfer C, Sliutz G, Gitsch G, Reinthaller A et al. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31A(10):1706–9. DOI: 10.1016/0959-8049(95)00353-k.
17. Speiser P, Wanner C, Tempfer C, Mittelböck M, Hanzal E, Bancher-Todesca D et al. CD44 is an independent prognostic factor in early-stage cervical cancer. *Int J Cancer*. 1997;74(2):185–8. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19970422)74:2<185::aid-ijc8>3.0.co;2-v.
18. Weng MY, Li L, Feng SY, Hong SJ. Expression of Bmi-1, p16, and CD44v6 in uterine cervical carcinoma and its clinical significance. *Cancer Biol Med*. 2012;9(1):48–53. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3941.2012.01.009.
19. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124–34. DOI: 10.1038/nm.4409.
20. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(11):669–80. DOI: 10.1038/s41568-018-0056-x.
21. Chopra S, Deodhar K, Pai V, Pant S, Rathod N, Goda JS et al. Cancer stem cells, CD44, and outcomes following chemoradiation in locally advanced cervical cancer: results from a prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2019;103(1):161–8. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2018.09.003.
22. Ghoneum A, Abdulfattah AY, Said N. Targeting the PI3K/AKT/mTOR/NFkB axis in ovarian cancer. *J Cell Immunol*. 2020;2(2):68–73. DOI: 10.33696/immunology.1.022.
23. Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Pentimalli F, Giordano A et al. Cancer stem cells and their possible implications in cervical cancer: a short review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):5167. DOI: 10.3390/ijms23095167.
24. Zhou HM, Zhang JG, Zhang X, Li Q. Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):62. DOI: 10.1038/s41392-020-00430-1.
25. Muralikrishnan V, Hurley TD, Nephew KP. Targeting aldehyde dehydrogenases to eliminate cancer stem cells in gynecologic malignancies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):961. DOI: 10.3390/cancers12040961.
26. Rezaiof A, Ahmadian E, Aazami H, Solgi G, Ebrahimi M. Gastric cancer stem cells effect on Th17/Treg balance; a bench to bedside perspective. *Front Oncol*. 2019;9:226. DOI: 10.3389/fonc.2019.00226.
27. Becerril-Rico J, Alvarado-Ortiz E, Toledo-Guzmán ME, Pelayo R, Ortiz-Sánchez E. The cross talk between gastric cancer stem cells and the immune microenvironment: a tumor-promoting factor. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):498. DOI: 10.1186/s13287-021-02562-9.
28. Chen S, Zhang S, Chen S, Ma F. The prognostic value and immunological role of CD44 in pan-cancer study. *Sci Rep*. 2023;13(1):7011. DOI: 10.1038/s41598-023-34154-3.
29. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environ-

- ment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells*. 2011;29(3):389–96. DOI: 10.1002/stem.592.
30. Jiang T, Diao X, Ding M, Niu X, Wang C, Qi Y et al. SR-B1 and CD10 combined immunoprofile for differential diagnosis of metastatic clear cell renal cell carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *J Mol Histol*. 2021;52(3):539–44. DOI: 10.1007/s10735-021-09963-3.
 31. Kadota K, Buitrago D, Lee MC, Villena-Vargas J, Sima CS, Jones DR et al. Tumoral CD10 expression correlates with high-grade histology and increases risk of recurrence in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2015;89(3):329–36. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.06.003.
 32. Khanh do T, Mekata E, Mukaisho K, Sugihara H, Shimizu T, Shiomi H et al. Prognostic role of CD10⁺ myeloid cells in association with tumor budding at the invasion front of colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2011;102(9):1724–33. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01987.x.
 33. Gjorgova-Gjeorgjievski S, Fritchie K, Folpe AL. CD10 (nephrin) expression: a potential adjunct in the distinction of hibernoma from morphologic mimics. *Hum Pathol*. 2021;110:12–9. DOI: 10.1016/j.humpath.2020.12.012.
 34. Ahlem B, Wided A, Amani L, Nadia Z, Amira A, Faten F. Study of Ki67 and CD10 expression as predictive factors of recurrence of ameloblastoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2015;132(5):275–9. DOI: 10.1016/j.anorl.2015.08.016.
 35. Gürel D, Kargi A, Karaman I, Onen A, Unlü M. CD10 expression in epithelial and stromal cells of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): a clinic and pathologic correlation. *Pathol Oncol Res*. 2012;18(2):153–60. DOI: 10.1007/s12253-011-9421-8.
 36. Kumagai-Togashi A, Uozaki H, Kikuchi Y, Watabe S, Numakura S, Watanabe M. Tumorous CD10 is more strongly related to the progression of urothelial carcinoma than stromal CD10. *Anticancer Res*. 2019;39(2):635–40. DOI: 10.21873/anticancer.13157.
 37. Wang S, Xiao Y, An X, Luo L, Gong K, Yu D. A comprehensive review of the literature on CD10: its function, clinical application, and prospects. *Front Pharmacol*. 2024;15:1336310. DOI: 10.3389/fphar.2024.1336310.
 38. Gaffoor N, Krishnamurthy J. Stromal expression of CD10 in breast carcinoma and its association with known prognostic factors – a tissue microarray-based study. *J Lab Physicians*. 2023;15(3):354–60. DOI: 10.1055/s-0043-1761925.
 39. Vo TN, Mekata E, Umeda T, Abe H, Kawai Y, Mori T et al. Prognostic impact of CD10 expression in clinical outcome of invasive breast carcinoma. *Breast Cancer*. 2015;22(2):117–28. DOI: 10.1007/s12282-013-0459-1.
 40. Wlodek J. Clinical significance of CD10 expression in cancer. *Int Clin Pathol J*. 2017;5(1):192–4. DOI: 10.15406/icpjl.2017.05.00121.
 41. Oba J, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Liu M, Abe T, Hagihara A et al. CD10-equipped melanoma cells acquire highly potent tumorigenic activity: a plausible explanation of their significance for a poor prognosis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149285. DOI: 10.1371/journal.pone.0149285.
 42. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;111(3):506–14. DOI: 10.1038/bjc.2014.289.
 43. Mishra D, Singh S, Narayan G. Role of B cell development marker CD10 in cancer progression and prognosis. *Mol Biol Int*. 2016;2016:4328697. DOI: 10.1155/2016/4328697.
 44. Wang Y, Li Q, Xu L, Chen J, Pu Y, Wang L et al. Cancer stemness of CD10-positive cells regulated by Hedgehog pathway promotes the resistance to cisplatin in oral squamous cell carcinoma. 2021;27(6):1403–11. DOI: 10.1111/odi.13673.
 45. Pu Y, Li Q, Wang Y, Xu L, Qiao Q, Guo Y et al. pERK-mediated IL8 secretion can enhance the migration, invasion, and cisplatin resistance of CD10-positive oral cancer cells. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1283. DOI: 10.1186/s12885-021-09025-7.
 46. Krishn SR, Ganguly K, Kaur S, Batra SK. Ramifications of secreted mucin MUC5AC in malignant journey: a holistic view. *Carcinogenesis*. 2018;39(5):633–51. DOI: 10.1093/carcin/bgy019.
 47. Hansson GC. Mucins and the microbiome. *Annu Rev Biochem*. 2020;89:769–93. DOI: 10.1146/annurev-biochem-011520-105053.
 48. Yamanoi K, Ishii K, Tsukamoto M, Asaka S, Nakayama J. Gastric gland mucin-specific O-glycan expression decreases as tumor cells progress from lobular endocervical gland hyperplasia to cervical mucinous carcinoma, gastric type. *Virchows Arch*. 2018;473(3):305–11. DOI: 10.1007/s00428-018-2381-6.
 49. Li H, Jing X, Yu J, Liu J, Zhang T, Chen S et al. A combination of cytokeratin 5/6, p63, p40 and MUC5AC are useful for distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the cervix. *Diagn Pathol*. 2020;15(1):104. DOI: 10.1186/s13000-020-01018-7.
 50. Turashvili G, Park KJ. Cervical glandular neoplasia: classification and staging. *Surg Pathol Clin*. 2019;12(2):281–313. DOI: 10.1016/j.path.2019.01.002.
 51. Balmaña M, Duran A, Gomes C, Llop E, López-Martos R, Ortiz MR et al. Analysis of sialyl-Lewis x on MUC5AC and MUC1 mucins in pancreatic cancer tissues. *Int J Biol Macromol*. 2018;112:33–45. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.148.

Информация об авторах

Арина Дмитриевна Колина – ординатор кафедры физиологии и патологии факультета фундаментальной медицины МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, врач-стажер отдела клинической патологии Университетской клиники МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Наталья Владимировна Данилова – доктор медицинских наук, доцент кафедры физиологии и патологии факультета фундаментальной медицины МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник отдела клинической патологии Университетской клиники МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Юлия Юрьевна Андреева – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Author information

Arina D. Kolina – Resident, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; Intern, Department of Clinical Pathology, University Clinic, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University.
<https://orcid.org/0009-0007-8669-5067>

Natalia V. Danilova – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; Senior Researcher, Department of Clinical Pathology, University Clinic, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; Leading Researcher, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Yulia Yu. Andreeva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Anatomic Pathology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.
<https://orcid.org/0000-0003-4749-6608>

Миграция нейтрофилов при воспалении и инфекции: современные данные и роль в формировании нейтрофильных фенотипов

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

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

² ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Резюме. Миграция нейтрофилов и ее роль в формировании их фенотипов во время воспаления оказались в центре повышенного интереса в последнее десятилетие. Использование новых модельных систем помогло раскрыть поведение нейтрофилов в поврежденных и инфицированных тканях. Давно известно, что в ответ на инфекцию или травму нейтрофилы быстро рекрутируются из кровяного русла в сайты воспаления, однако лишь в 2006 году установлено, что нейтрофилы из воспаленных тканей могут мигрировать через эндотелиальные клетки обратно в кровоток. Вопросы обратной миграции нейтрофилов и ее механизмы до настоящего времени представлены почти исключительно в работах иностранных авторов и требуют дальнейшего изучения. Данный обзор ориентирован на освещение этого феномена, чтобы привлечь внимание отечественных ученых к проблеме миграции нейтрофилов при инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Ключевые слова: нейтрофилы, миграция, воспаление, инфекция, гетерогенность нейтрофилов, нейтрофильный фенотип

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

Для цитирования: Сомова Л.М., Абрамова С.А., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Щелканов М.Ю. Миграция нейтрофилов при воспалении и инфекции: современные данные и роль в формировании нейтрофильных фенотипов. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):14–21. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.14-21.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 122041800135-3).

Статья поступила 26.02.2025. Получена после рецензирования 21.03.2025. Принята в печать 12.05.2025.

Neutrophil migration in inflammation and infection: role in the formation of neutrophilic phenotypes

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

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

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract. Neutrophil migration and its role in shaping neutrophil phenotypes during inflammation have been the focus of increased interest in the past decade. New model systems have facilitated the study of neutrophil behavior in damaged and infected tissues. Neutrophils have long been known to be rapidly recruited from the bloodstream to inflammation sites in response to infection or injury. However, reverse transendothelial migration was first demonstrated only in 2006. To date, research on reverse transendothelial migration and its mechanisms has been dominated by international studies, leaving gaps in understanding. This review synthesizes global findings on reverse transendothelial migration in order to attract the attention of Russia's scientists to this phenomenon in infectious and inflammatory diseases.

Keywords: neutrophils, migration, inflammation, infection, neutrophil heterogeneity, neutrophilic phenotype

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

For citation: Somova L.M., Abramova S.A., Lyapun I.N., Drobot E.I., Shchelkanov M.Yu. Neutrophil migration in inflammation and infection: role in the formation of neutrophil phenotypes. Clin. exp. morphology. 2025;14(5)14–21 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.14-21.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (No. 122041800135-3).

Received 26.02.2025. Received in revised form 21.03.2025. Accepted 12.05.2025.

Введение

Нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты) – самые распространенные лейкоциты в крови, которые являются первой линией антиинфекционной защиты организма и повреждения тканей. Миграция нейтрофилов и ее роль во время воспаления оказались в центре повышенного интереса в последнее десятилетие [1]. Достижения в области визуализации в реальном времени и использование новых модельных систем помогли раскрыть поведение нейтрофилов в поврежденных и инфицированных тканях. Во время реакции на инфекцию или травму они быстро рекрутируются из кровотока, образуя очаги воспаления. Однако нейтрофилы из воспаленных тканей могут мигрировать также в ретроградном направлении через эндотелиальные клетки [2]. Эти клетки составляют популяцию тканевых нейтрофилов с отчетливым поверхностным фенотипом (ICAM-1^{high}CXCR1^{low}) и называются обратными-мигрировавшими нейтрофилами.

Нейтрофилы являются важным элементом врожденной иммунной системы, хотя в последнее время также признается их роль в качестве регуляторных и эффекторных клеток [3]. Установлено, что при определенных условиях они могут приобретать черты антигенпрезентирующих клеток, которые поглощают и представляют экзогенные антигены, стимулируя дифференцировку цитотоксических лимфоцитов посредством прямого взаимодействия между нейтрофилами и наивными CD8⁺ Т-клетками [4]. Будучи мощными эффекторными клетками, нейтрофилы уничтожают инфекционные патогены посредством фагоцитоза, дегрануляции, активных форм кислорода (АФК) и нейтрофильных внеклеточных ловушек [5–7].

Роль нейтрофилов как клеток врожденного иммунитета при тканевых повреждениях исследована давно, поэтому большое значение представляет понимание нейтрофильной миграции в контексте как острого, так и хронического воспаления при инфекционных заболеваниях [8]. По данным S. de Oliveira et al. [1], в процессе миграции нейтрофилов при остром повреждении тканей различают три основные фазы: ранняя фаза рекрутирования, индуцированная кратковременными сигналами, фаза амплификации инфильтрации в ответ на стойкие вредные сигналы и фаза разрешения воспаления, которая может включать обратную миграцию нейтрофилов.

Прямая миграция нейтрофилов

Нейтрофилы образуются в костном мозге из стволовых клеток, которые делятся и дифференцируются в зрелые нейтрофилы, полностью оснащенные гранулярным арсеналом [7]. В системном кровотоке они циркулируют как спящие клетки. Прямая миграция представляет собой процесс поступательного проникновения нейтрофилов к месту повреждения и/или инфекции в процессе их экстравазации из сосудистой сети в ткани [9, 10]. Попав в очаги инфекции, нейтрофилы

убивают микроорганизмы микробицидными агентами, высвобождаемыми из гранул. В этой фазе задействованы некоторые сигналы, включая молекулярные структуры, связанные с повреждением, пероксид водорода, липидные медиаторы и хемокины. В результате прямой миграции лейкоцитов формируются воспалительные очаги в органах и тканях.

На современном этапе развития клеточной биологии раскрыта сложность защитной системы хозяина, в частности клеток врожденного иммунитета. Например, моноциты (или моноклеарные фагоциты), играющие важную роль в защите от патогенов и заживлении ран, общепризнанно являются морфологически, фенотипически и функционально гетерогенными [11]. Однако нейтрофилы долгое время считались относительно однородной популяцией клеток, поскольку традиционно их представляли короткоживущими клетками-«камикадзе», которые быстро прибывают в места инфекции и травмы, проявляют чрезмерную активность и погибают в инфильтрированной ткани.

Нейтрофилы экспрессируют более 30 разных рецепторов клеточной поверхности для распознавания инвазии патогенов и воспалительного окружения, включая рецепторы, связанные с G-белком, Fc-рецепторы, рецепторы адгезии, цитокиновые рецепторы и рецепторы распознавания образов, которые могут модулировать миграцию, функцию и поведение нейтрофилов [12]. Сигнальные пути этих рецепторов могут также влиять на транскрипционную активность нейтрофилов, фагоцитоз, апоптоз, дегрануляцию и продукцию АФК [13]. Как только нейтрофилы преодолевают многочисленные слои сосудистой стенки и попадают во внесосудистое пространство, они приобретают оптимизированный фенотип, имеющий способность к обнаружению поврежденных тканей и микробной очистке [14, 15].

Обратная миграция нейтрофилов

Считается, что для успешного разрешения воспаления необходимо удаление нейтрофилов из места повреждения, и этот клиренс нейтрофилов может происходить посредством их апоптоза или некроза и последующего фагоцитоза макрофагами [1, 16]. Исследования нейтрофилов мышей [17] и человека [18, 19] показали, что нейтрофилы могут покидать участки повреждения тканей в ходе процесса, называемого обратной миграцией (ОМ). С развитием методов визуализации в 2006 году впервые появилось сообщение о миграции нейтрофилов из очага воспаления обратно в сосудистую систему. На основании полученных данных сформулирована концепция обратной миграции, предполагающая, что этот феномен также является важным путем очистки тканей от активированных нейтрофилов [20]. Пути миграции при воспалении показаны на рисунке.

В 2017 году J. Wang et al. [21] изучили поведение нейтрофилов при стерильном повреждении и репарации,

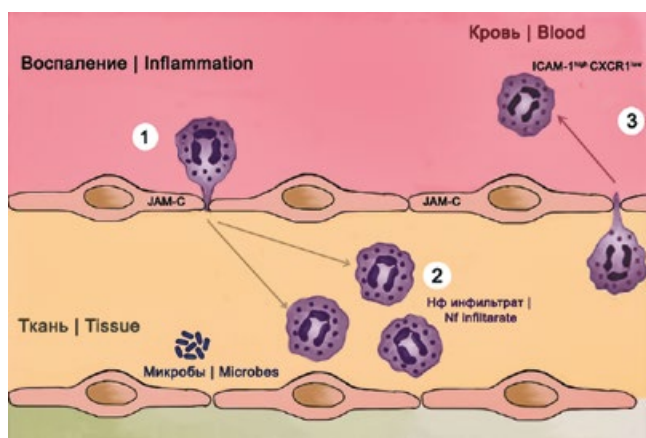


Рис. Миграция нейтрофилов при воспалении:

1) прямая миграция нейтрофилов из кровотока в очаг инфекции, 2) образование нейтрофильных (Нф) инфильтратов в инфицированной ткани, 3) обратная миграция нейтрофилов из ткани в кровоток и разрешение воспаления. Обратномигрировавшие нейтрофилы демонстрируют отчетливый фенотип, характеризующийся ICAM-1^{high}CXCR1^{low}

Fig. Neutrophil migration during inflammation:

1) direct neutrophil migration from the bloodstream to the infection site, 2) neutrophil formation (Nf) infiltrates in infected tissue, 3) reverse transendothelial migration and resolution of inflammation. The neutrophils exhibit a distinct phenotype characterized by ICAM-1^{high}CXCR1^{low}

подтвердив, что процесс ОМ происходит в две фазы: первая фаза – возвращение нейтрофилов из очага воспаления в кровеносное русло, вторая фаза – ОМ нейтрофилов из кровеносных сосудов снова в костный мозг для стимулирования апоптоза [2, 21]. При этом феномен возвращения нейтрофилов из очага воспаления в просвет сосудов также стал известен как обратная трансэндотелиальная миграция (ОТМ или гТЕМ).

Установлено, что после рекрутирования большинство нейтрофилов из сайтов повреждения возвращается в сосудистую систему. Количество нейтрофилов в месте повреждения достигает максимума через 12 часов после воздействия повреждающего фактора, через 24 часа их число уменьшается более чем на 90%, а через 48 часов они почти полностью исчезают, и только около 10% нейтрофилов подвергается апоптозу [21]. Усиление синтеза CXCR4 в нейтрофилах позволяет им возвращаться в костный мозг через CXCL12, и этот феномен предполагает, что нейтрофилы сначала перемещаются в легкие, а затем избирательно мигрируют в костный мозг посредством CXCR4 [21, 22].

Представляет интерес, каковы фенотип и судьба обратномигрировавших нейтрофилов. Установлено, что по сравнению с клетками в тканях и кровотоке нейтрофилы, подвергающиеся ОМ, приобретают уникальные фенотипы на основе определенных молекулярных маркеров [23], которые характеризуются вы-

соким уровнем молекул клеточной адгезии-1 (ICAM-1 или CD54), низким уровнем CXCR1, в то время как у нейтрофилов в резидентной ткани отмечен низкий уровень ICAM-1 и CXCR1, а для циркулирующих нейтрофилов характерен низкий уровень ICAM-1, но высокий уровень CXCR1 [23]. Это свидетельствует о том, что нейтрофилы в организме имеют несколько фенотипов, что отражает разные функции данного типа лейкоцитов.

Влияние обратной миграции нейтрофилов на макроорганизм

Полагают, что ОМ регулирует стадию воспаления, уменьшает задержку нейтрофилов в очаге воспаления и ускоряет разрешение локального воспаления [20], однако некоторые исследователи обнаружили, что ОМ способна приводить к перераспределению активированных нейтрофилов в другие органы и вызывать генерализацию системного воспаления [24, 25]. Феномен ОМ указывает на то, что нейтрофилы обладают множественными функциями, а точный контроль этого процесса может быть важной терапевтической стратегией, способствующей разрешению воспаления.

C.D. Buckley et al. [23] установили, что обратная трансмиграция нейтрофилов человека происходит через монослой эндотелия *in vitro*, идентифицировав маркеры, характерные для обратномигрировавших нейтрофилов (ICAM-1^{high}CXCR1^{low}), и выявили этот фенотип клеток в периферической крови пациентов с системным воспалением. В совокупности исследования этих авторов показали, что ОМ является потенциальной новой мишенью для лекарственной терапии заболеваний, характеризующихся чрезмерной нейтрофильной инфильтрацией.

Потенциальные механизмы обратной миграции нейтрофилов

Сигналы, которые опосредуют ОМ нейтрофилов из мест повреждения тканей, остаются в значительной степени неизвестными. Было предложено несколько механизмов для объяснения ОМ из воспаленных тканей, включая конкуренцию между источниками хемоаттрактантов в ране и сосудистой сети, а также снижение уровня раневых хемоаттрактантов и/или внутренние транскрипционные изменения нейтрофилов [26]. Вполне вероятно, что такой сложный процесс как ОМ нейтрофилов происходит за счет комбинации этих механизмов.

При поиске ответа на вопрос, от чего зависит, мигрируют ли нейтрофилы обратно в кровоток или погибают в месте повреждения, установлено, что их разные субпопуляции могут быть предрасположены к ОМ с момента выхода из кровообращения или из-за транскрипционных изменений, индуцированных в месте повреждения [27, 28]. На основании опытов *in vitro* высказано предположение [18, 19], что нейтрофилы с меньшей вероятностью будут обратно мигрировать из

мест инфекции, чтобы предотвратить распространение внутриклеточных патогенов.

Установлено, что нейтрофилы, подвергшиеся ОТМ *in vitro*, экспрессируют специфические маркеры: ICAM-1^{high} и CXCR1^{low}. Эти маркеры использовались для идентификации нейтрофилов, предположительно подвергшихся ОТМ, в периферической крови человека [23] и во вторичных очагах воспаления у мышей [29]. Важно отметить, что нейтрофилы человека и мыши, подвергшиеся ОТМ *in vitro* и *in vivo*, продуцируют более высокие уровни АФК [23, 29]. Хорошо известно, что активированные нейтрофилы склонны продуцировать АФК, избыток которых может привести к повреждению тканей или органов. После ОМ со сдвигом фенотипа в сторону провоспалительного состояния нейтрофилы продуцируют большое количество АФК [23, 29]. Эти клетки накапливаются в легких или других органах, что может легко вызвать повреждение тканей и быть одной из причин распространения системного воспаления из-за ОМ.

Пытаясь выяснить, является ОМ хорошим или плохим исходом воспаления, S. de Oliveira et al. показали [1], что хотя чрезмерная и длительная нейтрофильная инфильтрация может привести к развитию хронического воспаления тканей, миграция нейтрофилов обратно в кровоток способна вызвать системное воспаление и повреждение тканей дистальных органов. В случае повреждения тканей обратная миграция имеет положительные эффекты в локальном очаге воспаления, поскольку истощение нейтрофилов улучшает заживление ран, но может вызывать системные негативные последствия, такие как полиорганная недостаточность [30]. Следовательно, необходимы четкие доказательства того, что обратно-мигрировавшие нейтрофилы обладают про- или противовоспалительным фенотипом. Диссеминированные нейтрофилы, демонстрирующие сильный провоспалительный или противовоспалительный фенотип, могут иметь вредные эффекты, такие как содействие повреждению органов тканей или системной иммуносупрессии, соответственно.

Гетерогенность нейтрофилов у здоровых и болеющих людей

Нейтрофилы традиционно считаются короткоживущими терминально дифференцированными клетками врожденного иммунитета, фундаментальная роль которых заключается в антимикробной защите с широким спектром функций [31]. Потенциальное существование отдельных подмножеств (субпопуляций) нейтрофилов с функциональной и фенотипической гетерогенностью долгое время широко не исследовалось. В последнее десятилетие на разных моделях получены доказательства существования различных субпопуляций нейтрофилов как в физиологических, так и в патологических условиях [28, 32–35]. Исследования нейтрофильной гетерогенности начались еще в 1970–1980-х годах,

но проблема до сих пор остается актуальной. В связи с этим в настоящее время важным становится изучение разнообразия нейтрофильных фенотипов и их характеристик [36, 37].

Около 50–70% всех лейкоцитов периферической крови составляют циркулирующий гранулоцитарный пул [38]. Апоптоз лейкоцитов является основной формой естественной гибели нейтрофилов, которая, как известно [39, 40], протекает без воспаления.

По классификации М.П. Потапнева и соавторов (2019), с учетом этапов созревания в костном мозге, распределения в периферической крови, органах и тканях макроорганизма, выделяются различные фенотипические субпопуляции нейтрофилов [37]: незрелые (в костном мозге в норме, в периферической крови при патологических состояниях), зрелые (в периферической крови в норме и при патологических состояниях), зрелые активированные (в периферической крови при воспалительных процессах), стареющие (обычно в тканях, где нейтрофилы подвергаются удалению тканевыми макрофагами путем эффероцитоза).

В последние 20 лет установлена длительная продолжительность жизни нейтрофилов в периферической крови (вплоть до 90 часов и более), что может заложить основу для фенотипических и функциональных изменений этих клеток и объяснить гетерогенность нейтрофилов [22, 41]. При этом уже высказывалось предположение, что нейтрофилы способны переключаться с классического фенотипа на долгоживущий в зависимости от условий внутренней среды организма [42]. Выявлено, что нейтрофилы старых мышей («стареющая» подгруппа) имеют гиперсегментированное ядро и уменьшенный размер [43, 44]. Показано [43–46], что субпопуляция стареющих нейтрофилов имеет фенотип CD62L^{low} CXCR4^{high} CD11b^{high} CD49^{high}, а подтип N1 нейтрофилов с антинеопластической активностью – CD11b⁺/Ly6G⁺ (в отличие от иммуносупрессорных нейтрофилов) [47, 48]. Маркерами иммунофенотипа зрелых активированных при воспалении нейтрофилов являются CD15+CD11b^{high} CD16^{high} CD62L^{low} CD11c+CD10+CD66b^{high} CXCR2^{low} CXCR4^{high} [41]. Как отметили М.П. Потапнев и соавт. [37], фенотипические характеристики субпопуляций нейтрофилов не отражают напрямую их функцию. Установлено, что субпопуляционный состав нейтрофилов зависит от стадии и активности воспаления, имеет прогностическое значение и может учитываться при терапевтическом воздействии у пациентов [45].

В периферической крови циркулируют нейтрофилы с тремя или четырьмя сегментами ядра. Для нейтрофилов, покидающих кровеносное русло, характерно большее (четыре–пять) количество сегментов ядра, ассоциированное с высокой экспрессией молекул адгезии LFA-1, LFA-3, PECAM-1 [49].

Большинство нейтрофилов периферической крови в норме относится к популяции высокой плотности,

тогда как при патологических состояниях (в том числе при воспалении) часть лейкоцитов периферической крови выделяется как нейтрофилы низкой плотности, имеющие преимущественно незрелый тип морфологии (палочкоядерные клетки или миелоциты) [50, 51]. Это характерная субпопуляция провоспалительных нейтрофилов, идентифицированная как клетки фенотипа CD15⁺/CD14^{low}, CD10⁺/CD14^{low}, CD16^{high}/CD86. Такие нейтрофилы высвобождают повышенное количество интерферонов типа I и IFN- γ , а также TNF- α , однако они демонстрируют снижение фагоцитарной активности, для выяснения причины которого необходимы дальнейшие исследования. При септических состояниях в крови увеличивается содержание нейтрофилов низкой плотности с иммуносупрессорными характеристиками (G-MDSCs), что свидетельствует о тяжести заболевания [52, 53]. Популяция нейтрофилов низкой плотности в основном связана с аутоиммунными патологиями [53–55], сепсисом и синдромом системного воспалительного ответа [56]. Существуют также незрелые нейтрофилы костного мозга, характеризующиеся как клетки CD10^{low}/CD16^{low} и выявляемые при тяжелых системных инфекциях [57]. У пациентов с воспалением обнаружены зрелые нейтрофилы с оболочкой из антител CD11c^{right}/CD62L^{dim}/CD11b^{bright}/CD16^{bright}, уникальная циркулирующая популяция миелоидных клеток, способная подавлять пролиферацию Т-клеток человека [58].

Таким образом, нейтрофилы долго рассматривались только как гомогенная популяция клеток, фагоцитирующих микроорганизмы и обеспечивающих врожденный противоинфекционный иммунитет. В настоящее время функции и субпопуляционный состав нейтрофилов характеризуются большим разнообразием, то есть гетерогенностью. При патологических состояниях нейтрофилы не только мигрируют в очаг поражения/воспаления и погибают там, но частично подвергаются ОМ в кровотоке либо распространяются в другие органы и ткани, включая костный мозг.

Хотя до сих пор многие вопросы остаются без ответа, однозначно определено, что миграция нейтрофилов играет решающую роль в воспалительной патологии. В последнее время были разработаны модели и технологии, которые позволяют дополнительно выяснить сигналы прямой миграции и значение ОМ в патогенезе инфекционных заболеваний. Установлено, что молекула соединительной адгезии-С (JAM-C) имеет ключевое значение в стимулировании ОТМ нейтрофилов, которая способствует распространению системного воспаления и вторичному повреждению органов [24, 25]. Из очага воспаления нейтрофилы могут успешно прорываться через эндотелиальные клетки и возвращаться в кровоток вследствие наличия в сосудистой стенке специального канала, «переключателем» которого является JAM-C, регулирующая ОМ [29]. Разрушение JAM-C на эндотелиальных клетках или нокдаун гена *JAM-C* значительно увеличивают вероятность ОМ нейтрофи-

лов, которая в основном достигается парацеллюлярным путем [29]. Установлено, что нейтрофилам, которые мигрируют обратно в кровоток, трудно снова рекрутироваться в очаг воспаления [23], это указывает на то, что канал обратной миграции, связанный с JAM-C, является односторонним.

Основной интегрин b2 опосредует перемещение нейтрофилов вдоль эндотелиальных клеток к точкам парацеллюлярной (между эндотелиоцитами) и трансцеллюлярной (через эндотелиоциты) миграции [59]. ICAM-2, сконцентрированный в эндотелиальных клеточных соединениях, далее направляет нейтрофилы к проникновению в эндотелиальные клетки [60]. Считается, что трансцеллюлярный путь использует около 20% нейтрофилов, но он может сильно различаться в разных тканях и зависеть от стимуляции эндотелиальных клеток в условиях *in vitro* [59].

Заключение

В течение последнего десятилетия получены доказательства формирования различных фенотипов нейтрофилов как в физиологических, так и в патологических условиях, что имеет тесную связь с их миграционной способностью. Однако, несмотря на многолетние исследования, проблема нейтрофильной гетерогенности до сих пор остается актуальной, поэтому требуется дальнейшее углубленное изучение разнообразия нейтрофильных фенотипов и их функциональных характеристик. Точный контроль обратной миграции нейтрофилов может быть важной терапевтической стратегией, способствующей разрешению воспаления.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(6):378–91. DOI: 10.1038/nri.2016.49.
2. Xu Q, Zhao W, Yan M, Mei H. Neutrophil reverse migration. *J Inflamm (Lond).* 2022;19(1):22. DOI: 10.1186/s12950-022-00320-z.
3. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210(7):1283–99. DOI: 10.1084/jem.20122220.
4. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010;115(2):335–43. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216085.
5. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):377–96. DOI: 10.1002/jlb.4mir0220-574rr.
6. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159–75. DOI: 10.1038/nri3399.

7. *Borregaard N.* Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657–70. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
8. *Castanheira FVS, Kubes P.* Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019;133(20):2178–85. DOI: 10.1182/blood-2018-11-844530.
9. *Nourshargh S, Alon R.* Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;41(5):694–707. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
10. *Weninger W, Biro M, Jain R.* Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(4):232–46. DOI: 10.1038/nri3641.
11. *Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F.* Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669–92. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
12. *Futosi K, Fodor S, Mócsai A.* Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):638–50. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.
13. *Sun L, Ye RD.* Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(3):342–50. DOI: 10.1038/aps.2011.200.
14. *Kienle K, Lämmermann T.* Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunol Rev*. 2016;273(1):76–93. DOI: 10.1111/imr.12458.
15. *Wirhans S, Stefanie BS, Kopp HG.* Steady-state neutrophil homeostasis is a demand-driven process. *Cell Cycle*. 2013;12(5):709–10. DOI: 10.4161/cc.23859.
16. *Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP.* The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):59–66. DOI: 10.1038/nri3362.
17. *Loynes CA, Lee JA, Robertson AL, Steele MJ, Ellett F, Feng Y et al.* PGE₂ production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines inflammation resolution outcome *in vivo*. *Sci Adv*. 2018;4(9):eaar8320. DOI: 10.1126/sciadv.aar8320.
18. *Hamza B, Irimia D.* Whole blood human neutrophil trafficking in a microfluidic model of infection and inflammation. *Lab Chip*. 2015;15(12):2625–33. DOI: 10.1039/c5lc00245a.
19. *Hamza B, Wong E, Patel S, Cho H, Martel J, Irimia D.* Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels. *Integr Biol (Camb)*. 2014;6(2):175–83. DOI: 10.1039/c3ib40175h.
20. *Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A.* Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol*. 2006;80(6):1281–8. DOI: 10.1189/jlb.0506346.
21. *Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gantzer M, Meininger C, Kubes P.* Visualization of neutrophil function and fate during sterile injury and repair. *Science*. 2017;358(6359):111–6. DOI: 10.1126/science.aam9690.
22. *Marki A, Ley K.* Leaking chemokines confuse neutrophils. *J Clin Invest*. 2020;130(5):2177–9. DOI: 10.1172/JCI136259.
23. *Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C et al.* Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of endothelial reverse migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303–11. DOI: 10.1189/jlb.0905496.
24. *Wu D, Zeng Y, Fan Y, Wu J, Mulatibieke T, Ni J et al.* Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury. *Sci Rep*. 2016;6:20545. DOI: 10.1038/srep20545.
25. *Kim YR, Kim YM, Lee J, Park J, Lee JE, Hyun YM.* Neutrophils return to bloodstream through the brain blood vessel after crosstalk with microglia during LPS-induced neuroinflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:613733. DOI: 10.3389/fcell.2020.613733.
26. *Starnes TW, Huttenlocher A.* Neutrophil reverse migration becomes transparent with zebrafish. *Adv Hematology*. 2012;2012:398640. DOI: 10.1155/2012/398640.
27. *Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H et al.* Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004651. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004651.
28. *Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S.* Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol*. 2012;2(11):120134. DOI: 10.1098/rsob.120134.
29. *Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapoulis FM et al.* The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. *Nat Immunol*. 2011;12(8):761–9. DOI: 10.1038/ni.2062.
30. *Li L, Yan B, Shi YQ, Zhang WQ, Wen ZL.* Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J Biol Chem*. 2012;287(30):25353–60. DOI: 10.1074/jbc.M112.349126.
31. *Garley M, Jabłońska E.* Heterogeneity among neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(1):21–30. DOI: 10.1007/s00005-017-0476-4.
32. *Ellett F, Elks PM, Robertson AL, Ogryzko NV, Renshaw SA.* Defining the phenotype of neutrophils following reverse migration in zebrafish. *J Leukoc Biol*. 2015;98(6):975–81. DOI: 10.1189/jlb.3MA0315-105R.
33. *Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Mönch K, Doornbos-van der Meer B, Huitema MG, Stegeman CA et al.* Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One*. 2014;9(6):e99671. DOI: 10.1371/journal.pone.0099671.
34. *Welin A, Amirbeagi F, Christenson K, Björkman L, Björnsdóttir H, Forsman H et al.* The human neutrophil subsets defined by the presence or absence of OLFM4 both transmigrate into tissue *in vivo* and give rise to distinct NETs *in vitro*. *PLoS One*. 2013;8(7):e69575. DOI: 10.1371/journal.pone.0069575.
35. *Hong CW.* Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw*. 2017;17(5):298–306. DOI: 10.4110/in.2017.17.5.298.
36. *Андрюков Б.Г., Богданова В.Д., Ляпун И.Н.* Фенотипическая гетерогенность нейтрофилов: новые антимикробные характеристики и диагностические технологии. *Гематология и трансфузиология*. 2019;64(2):211–221. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-2-211-221.
- Andryukov BG, Bogdanova VD, Lyapun IN.* Phenotypic heterogeneity of neutrophils: new antimicrobial characteristics and diagnostic technologies. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian*

- journal of hematology and transfusiology. 2019;64(2):211–221 (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-2-211-221.
37. *Потапнев М.П., Гуцина Л.М., Мороз Л.А.* Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии. Иммунология. 2019;40(5):84–96. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009.
Potapnev MP, Hushchyna LM, Moroz LA. Human neutrophils subpopulations and functions heterogeneity in norm and pathology. Immunologiya. 2019;40(5):84–96 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009.
 38. *Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR.* Influence of microbes on neutrophil life and death. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:159. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00159.
 39. *Deniset JF, Kubes P.* Neutrophil heterogeneity: bona fide subsets or polarization states? J Leukoc Biol. 2018;103(5):829–38. DOI: 10.1002/JLB.3R10917-361R.
 40. *Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y.* Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. J Immunol Res. 2019;2019:8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
 41. *Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O.* Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. Blood. 2016;127(18):2173–81. DOI: 10.1182/blood-2016-01-688887.
 42. *Chakravarti A, Rusu D, Flamand N, Borgeat P, Poubelle PE.* Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. Lab Invest. 2009;89(10):1084–99. DOI: 10.1038/labinvest.2009.74.
 43. *Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N et al.* Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. Cell. 2013;153(5):1025–35. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.040.
 44. *Zhang D, Chen G, Mamwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ et al.* Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Nature. 2015;525(7570):528–32. DOI: 10.1038/nature15367.
 45. *Chaffield SM, Thieblemont N, Witko-Sarsat V.* Expanding neutrophil horizons: new concepts in inflammation. J Innate Immun. 2018;10(5-6):422–31. DOI: 10.1159/000493101.
 46. *Rankin SM.* The bone marrow: a site of neutrophil clearance. J Leukoc Biol. 2010;88(2):241–51. DOI: 10.1189/jlb.0210112.
 47. *Fridlender ZG, Albelda SM.* Tumor-associated neutrophils: friend or foe? Carcinogenesis. 2012;33(5):949–55. DOI: 10.1093/carcin/bgs123.
 48. *Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR.* Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. Clin Exp Immunol. 2007;149(1):155–61. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03376.x.
 49. *Кашутин С.Л., Данилов С.И., Верещагина Е.Н., Ключарева С.В.* Уровень экспрессии молекул адгезии на нейтрофилах в зависимости от сегментации их ядер. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;11:45–47. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21107695> (получено 24.02.2025).
 - Kashutin SL, Danilov SI, Vereschiagina EN, Klutchareva SV.* The expression level of adhesion molecules on neutrophils depending at the segmentation of their nuclei. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2013;11:45–47 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21107695> (accessed 24.02.2025).
 50. *Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA.* Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. Immunol Rev. 2016;273(1):48–60. DOI: 10.1111/imr.12448.
 51. *Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR et al.* A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. J Immunol. 2010;184(6):3284–97. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199.
 52. *Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G et al.* Low-density granulocytes are elevated in mycobacterial infection and associated with the severity of tuberculosis. PLoS ONE. 2016;11(4):e0153567. DOI: 10.1371/journal.pone.0153567.
 53. *Midgley A, Beresford MW.* Increased expression of low-density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. Lupus. 2016;25(4):407–11. DOI: 10.1177/0961203315608959.
 54. *Carmona-Rivera C, Kaplan MJ.* Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. Semin Immunopathol. 2013;35(4):455–63. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
 55. *Wright HL, Makki FA, Moots RJ, Edwards SW.* Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signaling. J Leukoc Biol. 2017;101(2):599–611. DOI: 10.1189/jlb.5A0116-022R.
 56. *Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J.* Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med. 2013;41(3):820–32. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318274647d.
 57. *Manz MG, Boettcher S.* Emergency granulopoiesis. Nat Rev Immunol. 2014;14(5):302–14. DOI: 10.1038/nri3660.
 58. *Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. J Clin Invest. 2012;122(1):327–36. DOI: 10.1172/JCI57990.
 59. *Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S.* Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. Curr Opin Hematol. 2010;17(1):9–17. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283333930.
 60. *Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejane E, Engelhardt B, Nourshargh S.* Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. Blood. 2009;113(24):6246–57. DOI: 10.1182/blood-2008-11-188375.

Информация об авторах

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

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

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

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

Михаил Юрьевич Щелканов – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с международным научно-образовательным Центром биологической безопасности в Школе медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Author information

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

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

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

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

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

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

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

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

Mikhail Yu. Shchelkanov – Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Head of the Department of Epidemiology, Microbiology and Parasitology with the International Scientific and Educational Center for Biological Safety, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.

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

Центролобулярные некрозы печени при сепсисе

В.С. Чирский, Е.А. Андреева, Н.А. Наливкина, В.С. Сидорин

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

Резюме. Введение. В настоящее время отсутствуют убедительная информация о времени и механизмах формирования центролобулярных некрозов печени при сепсисе, а также приемлемые для клинического использования лабораторные показатели, характеризующие этот феномен. Исследование данных вопросов и стало целью настоящего исследования.

Материалы и методы. Проведен клиничко-морфологический анализ 42 случаев летальных исходов у пациентов с сепсисом. При микроскопическом исследовании количественно определялись диаметр артериол и порталных трактов, индекс Керногана артериол, полнокривие, наличие тромбов, лейкоцитарного стаза, удельный объем нейтрофильных лейкоцитов, апоптотических телец, выраженность холестаза.

Результаты. При сепсисе в печени в 3-й зоне ацинусов обнаружены массивные центролобулярные некрозы гепатоцитов (43% умерших), центролобулярная дискомплексация гепатоцитов (24% умерших), очаговые некрозы гепатоцитов (33% умерших). Умершие в первые сутки после развития септического шока по характеру изменений гепатоцитов 3-й зоны ацинусов в основном распределялись на группы с очаговыми некрозами и центролобулярной дискомплексацией гепатоцитов. Начиная со вторых суток изменения печени в большей степени представлены массивными центролобулярными некрозами гепатоцитов. Примерно одинаковое среднее артериальное давление при центролобулярной дискомплексации гепатоцитов и массивных центролобулярных некрозах, а также более раннее развитие дискомплексации свидетельствуют о стадийности процесса ишемической гибели гепатоцитов.

Заключение. В центролобулярных отделах долек печени при сепсисе в зависимости от степени снижения артериального давления и времени, прошедшего после его развития, возникают массивные центролобулярные некрозы, центролобулярная дискомплексация и очаговые некрозы гепатоцитов, наличие которых в части случаев можно расценивать не только как форму, но и как стадию поражения печени при сепсисе. Основным механизмом формирования некроза гепатоцитов служит нарушение центральной гемодинамики вследствие септического шока.

Ключевые слова: сепсис, гипоксический гепатит, центролобулярный некроз, септический шок, билирубин

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

Для цитирования: Чирский В.С., Андреева Е.А., Наливкина Н.А., Сидорин В.С. Центролобулярные некрозы печени при сепсисе. Клин. экп. морфология. 2025;14(5):22–29. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.22-29.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 26.03.2025. **Получена после рецензирования** 02.06.2025. **Принята в печать** 27.06.2025.

Centrilobular liver necrosis in sepsis

V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, N.A. Nalivkina, V.S. Sidorin

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

Abstract. Introduction. The timing and mechanisms underlying centrilobular liver necrosis in sepsis remain poorly understood, and laboratory parameters suitable for clinical use have not yet been established. This study aimed to investigate these aspects.

Materials and methods. A clinical and morphological analysis was performed on 42 fatal cases of sepsis. Microscopic examination included quantitative assessment of the arteriole and portal tract diameters, the Kernohan index of arterioles, vascular plethora, the presence of clots, leukocyte stasis, the specific volume of neutrophilic leukocytes, apoptotic bodies, and the severity of cholestasis.

Results. In the centrilobular (zone 3) of the acini, we identified massive centrilobular hepatocyte necrosis (43% of cases), centrilobular hepatocyte dissociation (24%), and focal hepatocyte necrosis (33%). The

patients who died within 24 hours of developing septic shock most often presented with focal necrosis and centrilobular hepatocyte dissociation, whereas from day 2 onward, massive centrilobular hepatocyte necrosis predominated. Comparable mean arterial pressure values in patients with centrilobular hepatocyte dissociation and massive centrilobular necrosis, together with the earlier onset of dissociation, indicates a staged process of ischemic hepatocyte death.

Conclusion. In sepsis, the centrilobular zones of the liver are affected by massive centrilobular necrosis, centrilobular dissociation, and focal necrosis of hepatocytes, depending on the degree and duration of blood pressure decrease. In some cases, these processes may represent not only forms but also stages of liver damage. The primary mechanism of hepatocyte necrosis is central hemodynamic impairment resulting from septic shock.

Keywords: sepsis, hypoxic hepatitis, centrilobular necrosis, septic shock, bilirubin

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

For citation: Chirsky V.S., Andreeva E.A., Nalivkina N.A., Sidorin V.S. Centrilobular liver necrosis in sepsis. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):22–29 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.22-29.

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

Received 26.03.2025. **Received in revised form** 02.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

Сепсис продолжает оставаться одной из ведущих причин смерти пациентов как хирургических, так и терапевтических стационаров [1–4]. Его важнейшим и неотъемлемым патогенетическим звеном является синдром полиорганной недостаточности (СПОН) [5–7].

Поражение печени при СПОН характеризуется некрозом гепатоцитов преимущественно 3-й зоны ацинусов (центролобулярными некрозами) [8, 9]. Гибель гепатоцитов сопровождается гиперферментемией, а также вследствие нарушения внутрипеченочного транспорта билирубина паренхиматозной желтухой, в данном случае обозначаемой как сепсис-индуцированная [10–12]. Уровень общего билирубина при этом может составлять от 85 до 170 ммоль/л.

Анализ уровня общего билирубина в сыворотке крови используется для оценки функции печени при СПОН, в частности по шкале SOFA (Sequential Organ Failure Assessment, последовательная оценка органной недостаточности). При этом необходимо отметить, что его повышение характерно для поздних сроков септического процесса, когда морфологические изменения уже значительны [13, 14].

Несмотря на то, что некрозы гепатоцитов 3-й зоны ацинусов при сепсисе встречаются достаточно часто, до сих пор нет убедительных данных о времени их формирования и механизмах ишемического поражения органа (дилатация сосудов при шоке и/или обтурация их при тромбоваскулите и синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания), а также приемлемых для клинического использования лабораторных показателей, характеризующих этот феномен. Изучение данных вопросов и стало целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Изучены 42 случая летальных исходов у пациентов за период с 2010 по 2022 год с диагнозом «сепсис» (22 мужчины и 20 женщин) из архива кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии

имени С.М. Кирова. Исследование одобрено этическим комитетом академии (протокол № 290 от 23.03.2024). Во всех случаях при морфологическом исследовании были обнаружены некротические изменения гепатоцитов 3-й зоны ацинусов.

Средний возраст умерших составил $50,1 \pm 3,6$ года. Средняя длительность госпитализации – $14,4 \pm 2,6$ койко-дня.

Во всех наблюдениях сепсис имел бактериальную этиологию, при этом в подавляющем числе грамотрицательными микроорганизмами (88%). У 20 умерших бактериальный сепсис осложнил течение COVID-19, в 15 случаях была диагностирована менингококцемия.

Согласно критериям «Сепсис-3», в исследования включались случаи, в которых выполнялись следующие условия:

- наличие источника инфекции (в том числе менингококцемия),
- синдром полиорганной недостаточности.

Критериями исключения из исследования служили наличие у умерших первичного поражения печени: вирусный гепатит, цирроз, первичные злокачественные новообразования печени и метастатическое поражение.

Среди клинических показателей проанализированы уровень общего и прямого билирубина, активность аминотрансфераз, содержание лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов, гемоглобина в крови, концентрации общего белка и альбумина, лактата, факторов свертываемости крови. Учитывалось максимальное отклонение показателей от референтных значений, а также перед летальным исходом.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме того, проводилось иммуногистохимическое исследование с использованием антител к CD15 (система визуализации MP-001 Mouse/rabbit Multiplex detection system, Diagnostic Biosystems, США) для выявления нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов в ткани печени. При микроскопическом исследовании количественно определялись диаметр

артериол и портальных трактов, индекс Керногана артериол (рассчитывался как отношение толщины стенки сосуда к диаметру просвета, умноженное на 100), полнокровие, наличие тромбов, лейкоцитарного стаза, бактерий в просвете сосудов, удельный объем нейтрофильных лейкоцитов, апоптотических телец (тельца Каунсильмена) (подсчет среднего числа в поле зрения при $\times 400$). Выраженность холестаза оценивалась посредством подсчета числа полей зрения при $\times 200$, в которых имелись скопления желчи в протоках и цитоплазме гепатоцитов (всего оценивали 15 полей зрения).

Статистическая обработка результатов выполнена при помощи табличного редактора Excel (Microsoft, США), в частности его модулей «Анализ данных» и «Мастер диаграмм», а также пакета Statistica 10 for Windows (StatSoft, США). Описательная статистика числовых данных в группах наблюдения проводилась путем вычисления средних значений исследуемых величин и стандартных ошибок среднеквадратичного отклонения (m), а также медианы с определением 1-го и 3-го квартилей. Оценку статистической значимости показателей и различий оцениваемых выборок проводили по критерию Манна–Уитни для малых выборок при уровне $p < 0,05$.

Результаты

У пациентов, умерших от сепсиса, в печени в 3-й зоне ацинусов обнаруживались три группы некротических изменений гепатоцитов:

1. массивные центроlobулярные некрозы;
2. центроlobулярная дисконкомплексация;
3. очаговые некрозы.

Массивные центроlobулярные некрозы гепатоцитов (МЦНГ) выявлены у 18 из 42 умерших (43%) (рис. 1). Возраст умерших данной группы составил $56,5 \pm 3,5$ года, продолжительность госпитализации – $77,0 \pm 13,0$ суток.

Клинически у пациентов данной группы септический шок был диагностирован только в трети случаев (шесть из 18). Минимальный уровень среднего артериального давления у 75% умерших с МЦНГ был ниже 65 мм рт. ст. (медиана 52,0 [41,8; 65,0]) (табл.). Индекс Керногана артерий портальных трактов составлял $48,9 \pm 3,5$ единицы.

МЦНГ формировались у пациентов, как правило, не ранее чем через сутки, чаще – через двое суток (медиана 2,0 [1,0; 6,0]) после развития септического шока.

Уровень активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) у пациентов с МЦНГ был повышен, медиана составляла 114,0 ед/л (91,3; 296,2) и 167,3 ед/л (92,6; 364,5), соответственно. Во всех наблюдениях отмечались высокие уровни прокальцитонина (до 100,0 нг/мл). Уровень лактата достигал 24 ммоль/л (медиана 4,9 [3,6; 10,3]).

Гипербилирубинемия (медиана уровня общего билирубина 48,7 мкмоль/л [27,9; 99,1], прямого – 20,9 ммоль/л [6,5; 45,6]) отмечалась только у половины

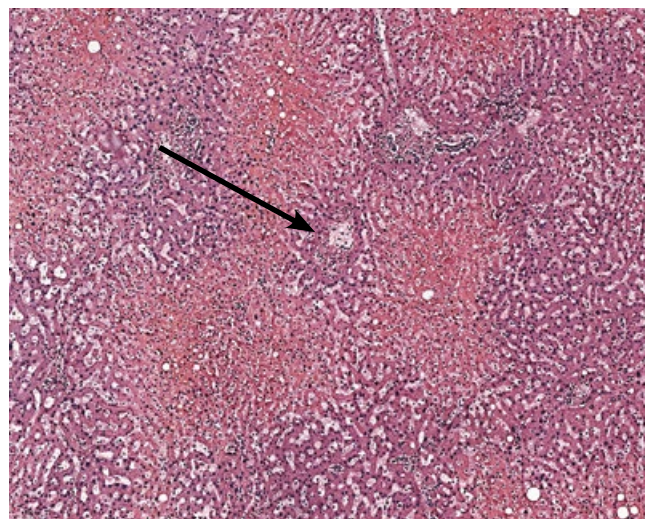


Рис. 1. Массивные некрозы гепатоцитов 3-й зоны ацинуса (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$
Fig 1. Massive necrosis of hepatocytes in zone 3 of the acinus (arrow). H&E stain, $\times 100$

умерших с МЦНГ. Уровень общего билирубина чаще соответствовал 1 баллу по шкале SOFA. При этом морфологические признаки холестаза выявлены у 83% умерших с МЦНГ. При наличии признаков холестаза медиана уровня общего билирубина составляла 24,3 мкмоль/л (13,0; 63,6), прямого – 20,9 мкмоль/л (6,5; 45,6). Уровень общего билирубина коррелировал с выраженностью морфологических признаков холестаза ($p = 0,59$, $p < 0,05$).

Лейкоцитарные стазы встречались у шести из 18 умерших данной группы (33%) (три в центральных венах, четыре в венах и два в артериях портальных трактов). Медиана удельного объема нейтрофильных лейкоцитов составляла 1,5 ед. (0,5; 3,6) (рис. 2).

Формирование фибриновых тромбов выявлено в четырех случаях из 18 (22%) (одно в центральных венах, два в венах и одно в артериях портальных трактов).

Сладж-феномен обнаружен в восьми случаях из 18 (44%) (два в центральных венах, пять в венах и шесть в артериях портальных трактов). В трех наблюдениях (17%) имели место диапедезные кровоизлияния в области портальных трактов, при этом тромбы в просвете микрососудов отсутствовали.

Удельный объем телец Каунсильмена в 1-й и 2-й зонах ацинусов составлял 0,9 ед. (0,3; 2,4) (табл.).

У 10 из 42 умерших (24%) изменения паренхимы печени в 3-й зоне ацинусов характеризовались центроlobулярной дисконкомплексацией гепатоцитов (ЦДГ). Средний возраст умерших данной группы был меньше, чем в случаях с массивными центроlobулярными некрозами, и составил $31,2 \pm 6,0$ года, длительность госпитализации – $8,5 \pm 3,0$ суток. В данной группе септический шок диагностировался в 70% случаев. У всех пациентов с ЦДГ длительность послешокового периода составляла около одних суток (медиана

Таблица | Table

Клиническая характеристика форм некроза гепатоцитов | Clinical characteristics of different forms of hepatocyte necrosis

Показатель Indicator	Массивные центрлобулярные некрозы гепатоцитов (n=18) Massive centrilobular necrosis (n=18)	Центролобулярная дискомплексация гепатоцитов (n=10) Centrilobular hepatocyte dissociation (n=10)	Очаговые центрлобулярные некрозы гепатоцитов (n=14) Focal centrilobular necrosis (n=14)
Частота развития, % Frequency of development, %	37,5	20,8	31,8
Длительность послешокового периода, суток Time since shock onset, days, Me (Q1; Q3)	2,0 (1,0; 6,0)	1,0 (0,5; 1,5)	0,5 (0,5; 0,5)
Минимальное систолическое артериальное давление, мм рт. ст. Minimum arterial pressure, mmHg, Me (Q1; Q3)	52,5 (46,8; 65,0)	50,0 (47,0; 67,0)	58,5 (53,5; 64,0)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{L}$, Me (Q1; Q3)	18,5 (9,9; 22,4)	22,8 (15,5; 31,4)	13,0 (10,0; 23,7)
Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, $\mu\text{mol/L}$, Me (Q1; Q3)	23,6 (12,8; 63,6)	16,6 (12,8; 24,2)	28,6 (12,8; 34,6)
Билирубин прямой, мкмоль/л Direct bilirubin, $\mu\text{mol/L}$, Me (Q1; Q3)	20,9 (6,5; 45,6)	13,8 (5,5; 70,9)	10,8 (6,5; 21,9)
АЛТ, ед/л ALT, units/L, Me (Q1; Q3)	114,0 (91,3; 296,2)	79,1 (10,7; 188,3)	67,0 (0,5; 114,0)
АСТ, ед/л AST, units/L, Me (Q1; Q3)	167,3 (92,6; 364,5)	106,8 (69,1; 590,5)	83,9 (31,7; 179,0)
Прокальцитонин, нг/мл Procalcitonin, ng/mL, Me (Q1; Q3)	21,2 (1,2; 80,0)	9,8 (3,3; 31,9)	8,3 (6,0; 10,0)
Частота холестаза, % Frequency of cholestasis, %	83,0	37,5	33,0
Апоптоз, абсолютное количество в поле зрения, $\times 400$ Apoptosis, absolute quantity in the field of view, $\times 400$, Me (Q1; Q3)	0,9 (0,3; 2,4)	1,6 (0,6; 1,9)	1,9 (0,6; 4,0)
Количество нейтрофильных лейкоцитов в поле зрения, $\times 400$ Number of neutrophilic leukocytes the in field of view, $\times 400$, Me (Q1; Q3)	1,5 (0,5; 3,6)	7,8 (1,7; 9,2)	4,7 (1,0; 9,0)
Индекс Керногана Kernohan index	48,9 $\pm$ 3,5	45,5 $\pm$ 6,3	44,1 $\pm$ 3,0
Лейкоцитарные стазы, % случаев Leukocyte stasis, % of cases	33,0	20,0	14,0
Сладж-феномен, % Blood sludge, %	44,0	40,0	36,0
Диapedезные кровоизлияния, % Diapedetic hemorrhages, %	17,0	10,0	0,0

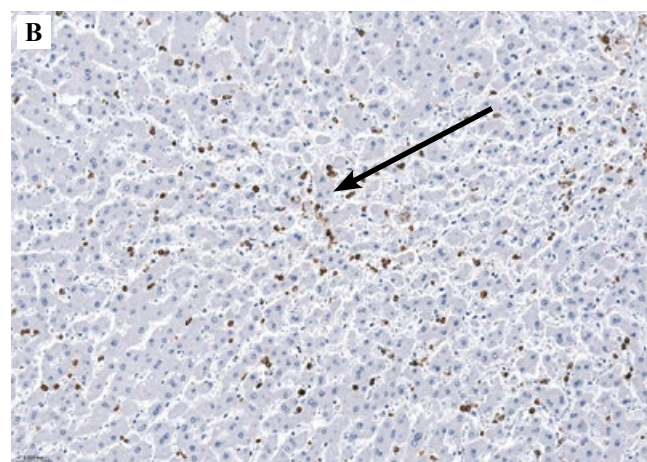
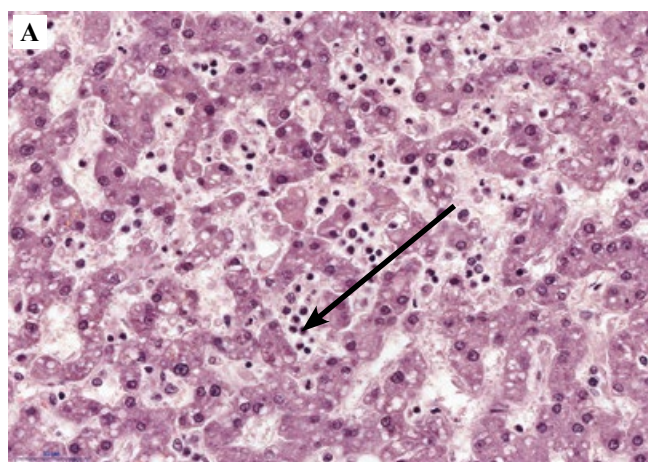


Рис. 2. А – нейтрофильные лейкоциты в просвете синусоидов (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. В – CD15+ лейкоциты в просвете синусоидов (стрелка). Иммуногистохимическая реакция с CD15, $\times 100$

Fig. 2. A – neutrophilic leukocytes in the lumen of sinusoids (arrow). H&E stain, $\times 200$. B – CD15+ leukocytes in the lumen of sinusoids (arrow). Immunohistochemical reaction with CD15, $\times 100$

1,0 суток [0,5; 1,5]). Среднее артериальное давление максимально снижалось до 31,0 мм рт. ст. (медиана 50,0 мм рт. ст. [47,0; 67,0]). Индекс Керногана артерий портальных трактов составлял $45,5 \pm 6,3$ единицы.

Во всех наблюдениях отмечалось повышение уровня трансаминаз, в среднем активность АЛТ и АСТ находилась на уровне $152,1 \pm 85,4$ ед/л и $257,8 \pm 119,6$ ед/л (медиана АЛТ 79,1 ед/л [10,7; 188,3], АСТ – 106,8 ед/л [69,1; 590,5]). Прокальцитонин также был повышен (медиана 9,8 нг/мл [3,3; 31,9]).

Гипербилирубинемия выявлена у двух умерших (48,8 и 161,0 мкмоль/л) и соответствовала 2–3 баллам по шкале полиорганной недостаточности, морфологические признаки холестаза встречались чаще (в 38% наблюдений), медиана уровня общего билирубина при этом составляла 14,1 мкмоль/л (6,7; 161,0), прямого билирубина – 62,6 мкмоль/л (4,6; 120,6).

Лейкоцитарные стазы встречались в двух из 10 случаев (20%) (один в венах и один в артериях портальных трактов). Удельный объем нейтрофильных лейкоцитов составлял 7,8 единицы (1,7; 9,2), в сравнении с группой с МЦНГ он был достоверно выше ($p=0,039$).

Формирование фибриновых тромбов выявлено в половине случаев (четыре в венах и одно в артериях портальных трактов).

Сладж-феномен обнаружен в четырех случаях из 10 (40%) (четыре в венах и три в артериях портальных трактов). В одном случае (10%) имели место диапедзные кровоизлияния в области портальных трактов.

Удельный объем телец Каунсильмена в 1-й и 2-й зонах ацинусов составлял 1,6 ед. (0,6; 1,9) (табл.).

Очаговые центрлобулярные некрозы гепатоцитов (ОЦНГ) встречались у 14 умерших (33%). Они представляли собой некроз групп гепатоцитов с очаговым скоплением полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 3).

Средний возраст умерших составил $41,0 \pm 7,9$ года, длительность госпитализации – $6,3 \pm 1,9$ суток.

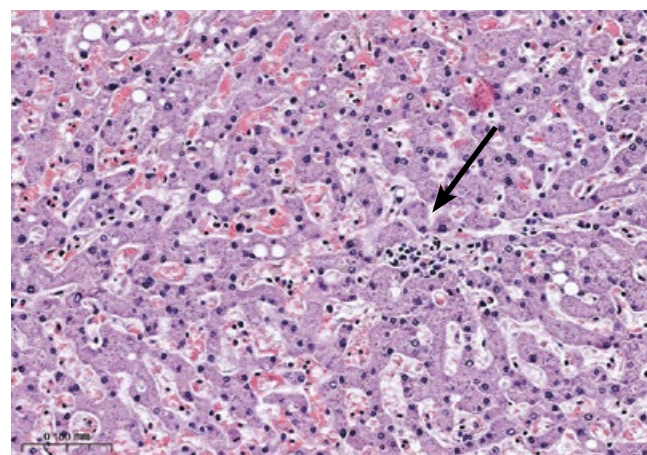


Рис. 3. Очаговые некрозы гепатоцитов 3-й зоны ацинуса (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 3. Focal necrosis of hepatocytes in zone 3 of the acinus (arrow). H&E stain, $\times 200$

В данной группе септический шок диагностировали в 50% случаев. Длительность послешокового периода в 12 наблюдениях (86%) составила менее суток, в двух – больше недели (восемь и 19 суток). Минимальный уровень среднего артериального давления был $64,3 \pm 4,3$ мм рт. ст. (медиана 58,5 мм рт. ст. [53,5; 64,0]). Индекс Керногана артерий портальных трактов составлял $44,1 \pm 3,0$ единицы.

Уровень трансаминаз был несколько повышен (медиана АЛТ 67,0 ед/л [0,5; 114,0], АСТ – 83,9 ед/л [31,7; 179,0]). Медиана уровня прокальцитонина составляла 8,3 нг/мл (6,0; 10,0), он оказался самым низким среди групп.

Гипербилирубинемия выявлялась в 56% случаев (32,7 мкмоль/л [28,6; 38,9]), в большинстве наблюдений соответствовала 2 баллам по шкале SOFA. При микроскопическом исследовании признаки хо-

лестазы выявлялись в 27% случаев, медиана общего билирубина в этих случаях составила 36,8 мкмоль/л (34,6; 38,9), прямого билирубина – 18,1 мкмоль/л (13,5; 22,6).

Лейкоцитарные стазы встречались в двух случаях из 14 (14%) (в одном случае в центральных венах, в другом и в венах, и в артериях портальных трактов). Медиана количества нейтрофильных лейкоцитов в поле зрения при $\times 400$ составила 4,7 единицы (1,0; 9,0).

Формирование фибриновых тромбов выявлено в трех случаях (21%) (два в центральных венах, одно в венах портальных трактов).

Сладж-феномен обнаруживался в пяти случаях из 14 (36%) (один в центральных венах, четыре в венах и три в артериях портальных трактов). Диапедзные кровоизлияния отсутствовали во всех случаях.

Удельный объем телец Каунсильмена составил 1,9 единицы (0,6; 4,0) (табл.).

Обсуждение

Результаты исследования показали, что характер и выраженность некротических изменений гепатоцитов в 3-й зоне ацинусов в первую очередь связаны со степенью снижения артериального давления и временем, прошедшим после развития септического шока.

Так, умершие в первые сутки после развития шока по характеру изменений гепатоцитов 3-й зоны ацинусов в основном распределяются на группы с ОЦНГ (медиана систолического артериального давления (САД) 58,5 мм рт. ст.) и с ЦДГ, где снижение артериального давления более выраженное (САД 50,0 мм рт. ст. [47,0; 67,0]). Начиная со вторых суток изменения в печени у умерших в большей степени представлены МЦНГ (САД 52,5 мм рт. ст. [46,8; 65,0]). Примерно одинаковое САД при ЦДГ и МЦНГ, а также более раннее развитие ЦДГ свидетельствуют о стадийности процесса ишемической гибели гепатоцитов.

Кроме уровня САД подтверждением роли нарушения центральной гемодинамики в формировании некротических изменений гепатоцитов служит уровень индекса Керногана артериол портальных трактов – более низкий (большая дилатация сосудов сразу после развития шока) в группах с ЦДГ и ОЦНГ в сравнении с умершими с МЦНГ.

Наличие и соответствие признаков активации свертывающей системы крови (выявление в паренхиме печени сладж-феномена, фибриновых тромбов, диапедзных кровоизлияний) некротическим изменениям гепатоцитов свидетельствуют о ее роли в формировании некроза клеток печени при сепсисе, при этом степень активации свертывающей системы не позволяет рассматривать данный механизм как ведущий при септическом поражении печени.

Морфологическая степень повреждения гепатоцитов (очаговые некрозы, дискомплексация гепатоцитов, массивные центролобулярные некрозы) подтверждается клинико-лабораторными проявлениями синдрома

цитолиза – уровнями активности АЛТ, АСТ, гипербилирубинемии [12], имеющими при этом некоторые особенности. Так, амплитуда активности АСТ выше, чем АЛТ, что, возможно, связано с общими ишемическими повреждениями в организме при сепсисе, степени повреждения гепатоцитов соответствовал только уровень прямого билирубина.

Описываемый в литературе при сепсисе гипоксический гепатит, клинически характеризуемый длительным или транзиторным повышением активности трансаминаз в сыворотке крови (в 20 раз по сравнению с верхней границей нормы) в условиях сосудистой, сердечной или дыхательной недостаточности при исключении иных причин повреждения печени, встречается достаточно редко. В нашем исследовании, несмотря на выраженные некротические изменения в гепатоцитах в изучаемых группах, только три наблюдения, соответствовали критериям гипоксического гепатита. При этом изменения 3-й зоны ацинусов в двух из них были представлены массивными центролобулярными некрозами, а в одном имели место очаговые некрозы гепатоцитов.

Схожая картина наблюдалась и при оценке уровня гипербилирубинемии у умерших с некротическими изменениями 3-й зоны ацинусов. Согласно данным литературы [14], значимое повышение уровня билирубина отмечается примерно в 15% случаев гипоксического гепатита. Чувствительность этого метода оценки повреждения печени у пациентов в ранние сроки септического процесса также явно недостаточна, обосновывая необходимость поиска новых подходов.

Данный феномен ставит вопрос о критериях диагноза «гипоксический гепатит» и возможности использования его при оценке ишемических поражений печени при шоке.

Заключение

В центролобулярных отделах печени при сепсисе в зависимости от степени снижения артериального давления и времени, прошедшего после его развития, возникают массивные центролобулярные некрозы, центролобулярная дискомплексация и очаговые некрозы гепатоцитов, наличие которых в части случаев можно расценивать не только как форму, но и как стадию поражения (центролобулярная дискомплексация гепатоцитов и массивные центролобулярные некрозы гепатоцитов) печени при сепсисе.

Основным механизмом формирования некроза гепатоцитов служит нарушение центральной гемодинамики вследствие септического шока. Ишемическое повреждение печени из-за тромбоскулита существенного значения в генезе формирования печеночной недостаточности не имеет.

Клинико-лабораторным показателем, в большей степени характеризующим повреждение печени при сепсисе, является уровень прямого билирубина в сыворотке крови.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.С. Чирский, Е.А. Андреева, В.С. Сидорин.

Сбор и обработка материала – В.С. Чирский, Е.А. Андреева, Н.А. Наливкина.

Написание текста – В.С. Чирский, Е.А. Андреева, Н.А. Наливкина.

Редактирование – В.С. Чирский, Е.А. Андреева, В.С. Сидорин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, V.S. Sidorin.

Collected the data and performed the analysis – V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, N.A. Nalivkina.

Wrote the paper – V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, N.A. Nalivkina.

Edited the manuscript – V.S. Chirsky, E.A. Andreeva, V.S. Sidorin.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

- Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045. DOI: 10.1038/nrdp.2016.45.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M et al. Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses and evolving understanding. *Physiol Rev*. 2013;93(3):1247–88. DOI: 10.1152/physrev.00037.2012.
- Руднов В.А., Кулабухов В.В. Сепсис-3: обновленные ключевые положения, потенциальные проблемы и дальнейшие практические шаги. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2016;13(4):4–11. DOI: 10.21292/2078-5658-2016-13-4-4-11.
Rudnov VA, Kulabukhov VV. Sepsis-3: updated main definitions, potential problems and next practical steps. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii = Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2016;13(4):4–11 (In Russ.). DOI: 10.21292/2078-5658-2016-13-4-4-11.
- Чирский В.С., Юзвинкевич А.К., Андреева Е.А. Критерии морфологической диагностики сепсиса. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018;64(4):66–71. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=36462884> (получено 24.03.2025).
Chirsky VS, Yuzvinkevich AK, Andreeva EA. Criteria for morphological diagnosis of sepsis. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;64(4):66–71 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=36462884> (accessed 24.03.2025).
- Корольков А.Ю., Попов Д.Н., Кутаева М.А., Танцев А.О. Критерии диагностики и лечебная тактика при остром холангите и билиарном сепсисе: взгляд с современных позиций. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2019;S1:40–43. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38166078> (получено 24.03.2025).
Korolkov AY, Popov DN, Kutayeva MA, Tantsev AO. Diagnostic criteria and management of acute cholangitis and biliary sepsis: the modern view on the problem. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019;S1:40–43 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38166078> (accessed 24.03.2025).
- Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Андреевская С.Г., Черкасова М.Н. Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла. *Патогенез*. 2017;15(4):32–37. DOI: 10.25557/GM.2018.4.9746.
Borovaya TG, Zhukhovitsky VG, Andreevskaya SG, Cherkasova MN. Histological changes of the liver and kidneys in experimental sepsis related with structural features of their microvasculature. *Patogenez = Pathogenesis*. 2017;15(4):32–37 (In Russ.). DOI: 10.25557/GM.2018.4.9746.
- Воробьева О.В. Изменения в органах при инфицировании COVID-19 с развитием септикопиемии. *Профилактическая медицина*. 2021;24(10):89–93. DOI: 10.17116/profmed.20212410189.
Vorobyeva OV. Changes in organs in COVID-19 infection with septicopyemia. *Russian Journal of Preventive Medicine*. 2021;24(10):89–93 (In Russ.). DOI: 10.17116/profmed.20212410189.
- Чирский В.С., Андреева Е.А., Юзвинкевич А.К., Гайворонский И.В. Патологоанатомическая характеристика септического шока в условиях современной терапии. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020;9(1):69–76. DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-69-76.
Chirskii VS, Andreeva EA, Yuzvinkevich AK, Gaivoronskii IV. Pathological characteristics of septic shock in modern therapy. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020;9(1):69–76 (In Russ.). DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-69-76.
- Свиридова С.П., Патютко Ю.И., Сотников А.В. Сепсис и дисфункция печени – современное состояние проблемы. *Вестник интенсивной терапии*. 2016;1:3–12. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=26487711> (получено 24.03.2025).
Sviridova SP, Patyutko YuI, Sotnikov AV. Sepsis and liver dysfunction: state of the art. *Annals of Critical Care*. 2016;1:3–12 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=26487711> (accessed 24.03.2025).
- Скворцов В.В., Горбач А.Н. Сепсис-индуцированная дисфункция печени: современная диагностика и стратегии лечения. Эффективная фармакотерапия. 2020;16(15):80–84. DOI: 10.33978/2307-3586-2020-16-15-80-84.
Skvortsov VV, Gorbach AN. Sepsis-induced liver dysfunction: current diagnosis and treatment strategies. *Effective pharmacotherapy*. 2020;16(15):80–84 (In Russ.). DOI: 10.33978/2307-3586-2020-16-15-80-84.
- Мишнев О.Д., Туманова У.Н., Щеголев А.И. Патология печени при сепсисе. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;8-2:267–271. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29902359> (получено 24.03.2025).

- Mishnev OD, Tumanova UN, Shchegolev AI.* Pathology of the liver in sepsis. *International Journal of Applied and Fundamental Research.* 2017;8-2:267–271 (In Russ). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29902359> (accessed 24.03.2025).
13. *Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R et al.* Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, doubleblind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med.* 2004;32(1):1–12. DOI: 10.1097/01.CCM.0000105118.66983.19.
 14. *Сторожаков Г.И., Осканова Р.С., Ильченко Л.Ю., Косюра С.Д., Федоров И.Г.* Гипоксический гепатит. Архивъ внутренней медицины. 2014;20(6):42–47. DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-6-42-47.
 - Storozhakov GI, Oskanova RS, Ilchenko LYu, Kosyura SD, Fedorov IG.* Hypoxic hepatitis. *The Russian Archives of Internal Medicine.* 2014;20(6):42–47 (In Russ.). DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-6-42-47.

Информация об авторах

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

Елена Анатольевна Андреева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Наталья Александровна Наливкина – старший преподаватель кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Василий Сергеевич Сидорин – доктор медицинских наук, доцент, научный сотрудник научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Author information

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

Elena A. Andreeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Anatomic Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0003-1973-9211>

Natalya A. Nalivkina – Senior Lecturer, Department of Anatomic Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0001-9592-6858>

Vasiliy S. Sidorin – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Researcher, Research Department (Medical and Biological Research), S.M. Kirov Military Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0001-5116-1291>

Иммуногистохимические предикторы аденокарциномы и плоскоклеточного рака пищевода

К.С. Масленкина¹, Л.М. Михалева¹, М.С. Науменко¹, М.Ю. Гущин¹,
В.В. Печникова¹, А.С. Конторщиков¹, К.Ю. Мидибер^{1,2}, А.Е. Бирюков¹

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

² ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

Резюме. Введение. Во всем мире растет показатель заболеваемости раком пищевода, при этом данную патологию чаще всего выявляют на поздних стадиях, что определяет плохой прогноз и низкую 5-летнюю выживаемость. Это ведет к необходимости поиска предикторов аденокарциномы и плоскоклеточного рака пищевода. Целью нашего исследования было оценить иммуногистохимический профиль маркеров, определяющих дифференцировку и биологическое поведение этих новообразований.

Материалы и методы. В исследование вошли 100 пациентов с морфологически подтвержденным раком пищевода. Биопсированные фрагменты слизистой оболочки пищевода, полученные при эзофагогастродуоденоскопии, фиксировали в 10% забуференном формалине. Проводилось окрашивание гистологических срезов гематоксилином и эозином, а также реактивом Шиффа в сочетании с альциановым синим по стандартной методике. Выполнялось иммуногистохимическое окрашивание с маркерами p53, p16, Ki67, CK5/6, p63, MUC5AC, MUC6, MUC2.

Результаты. Из 100 пациентов у 40 диагностирован плоскоклеточный рак, у 53 аденокарцинома пищевода, у семи анапластический рак. Высокий уровень реакции на p53 выявлен у 45,83% пациентов с плоскоклеточным раком и у 50% пациентов с аденокарциномой пищевода (различия статистически незначимые). В обоих типах рака пищевода гиперреакция на p16 несколько чаще встречалась у пациентов с низким уровнем реакции на p53 и преобладала у пациентов с аденокарциномой. Высокий уровень выраженности реакции на Ki67 чаще наблюдался при p53+ в обоих гистологических типах рака пищевода.

Заключение. Определение уровня реакции на иммуногистохимические маркеры p53, p16 и Ki67 в аденокарциноме и плоскоклеточном раке пищевода представляет ценность для установления прогноза заболевания.

Ключевые слова: рак пищевода, аденокарцинома пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, прогноз, иммуногистохимические маркеры, p53

Для корреспонденции: Ксения Сергеевна Масленкина. E-mail: ksusha-voi@yandex.ru

Для цитирования: Масленкина К.С., Михалева Л.М., Науменко М.С., Гущин М.Ю., Печникова В.В., Конторщиков А.С., Мидибер К.Ю., Бирюков А.Е. Иммуногистохимические предикторы аденокарциномы и плоскоклеточного рака пищевода. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):30–38. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.30-38.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 12.05.2025. Получена после рецензирования 06.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

Immunohistochemical predictors of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus

K.S. Maslenkina¹, L.M. Mikhaleva¹, M.S. Naumenko¹, M.Yu. Gushchin¹,
V.V. Pechnikova¹, A.S. Kontorshchikov¹, K.Yu. Midiber^{1,2}, A.E. Birukov¹

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

² Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The incidence of esophageal cancer is rising worldwide; however, this disease is often diagnosed at advanced stages, which leads to poor prognosis and low 5-year survival. Thus, the search for prognostic predictors for both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus is necessary. The aim of our study was to evaluate the immunohistochemical profile of markers that define differentiation and biological behavior of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus.

Materials and methods. The research included 100 patients with morphologically proven esophageal cancer. Biopsy specimens of esophageal mucosa obtained during EGDS were fixed in 10% buffered formalin and stained with hematoxylin and eosin and combined PAS/Alcian blue. We performed immunohistochemical evaluation with the following markers: p53, p16, Ki-67, CK5/6, p63, MUC5AC, MUC6, and MUC2.

Results. Forty patients had squamous cell carcinoma, 53 adenocarcinoma, and 7 anaplastic cancer. High p53 expression was shown in 45.83% of patients with squamous cell cancer and in 50% of patients with adenocarcinoma (no statistical difference: $p > 0.05$, Fisher's test). High p16 IHC level prevailed in adenocarcinoma (54% vs. 8.33%, $p < 0.05$, Fisher's test). In both cancer types, high p16 IHC level was more common in patients with low p53 IHC level. High Ki-67 more often coincided with high p53 IHC levels in both histological types of esophageal cancer ($p < 0.01$, Fisher's test).

Conclusion. Immunohistochemical evaluation with p53, p16, and Ki-67 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma provides valuable information for disease prognosis.

Keywords: esophageal cancer, esophageal adenocarcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, prognosis, immunohistochemical markers, p53

Corresponding author: Ksenia S. Maslenkina. E-mail: ksusha-voi@yandex.ru

For citation: Maslenkina K.S., Mikhaleva L.M., Naumenko M.S., Guschin M.Yu., Pechnikova V.V., Kontorschikov A.S., Midiber K.Yu., Birukov A.E. Immunohistochemical predictors of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):30–38 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.30-38.

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

Received 12.05.2025. **Received in revised form** 06.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

В настоящее время рак пищевода находится на восьмом месте по частоте заболеваемости и на шестом месте среди причин смерти от онкологических заболеваний [1]. По данным проекта «Глобальная заболеваемость раком, смертность и распространенность», в 2020 году стандартизованная по возрасту заболеваемость раком пищевода составила 6,3 на 100 000 человек, а смертность от рака пищевода – 5,6 на 100 000 человек [2]. Плоскоклеточный рак пищевода составляет около 85% всех диагностированных случаев, вторым гистологическим типом по встречаемости (14%) является аденокарцинома пищевода, в ряде европейских стран выходящая на первое место по частоте заболеваемости. Рак пищевода часто диагностируют на поздних стадиях заболевания (по данным Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER), в 32% вновь диагностированных случаев рака пищевода определяются метастазы в регионарных лимфатических узлах и в 38% отдаленные метастазы [3]), что определяет плохой прогноз онкологического заболевания. 5-летняя выживаемость у пациентов с раком пищевода составляет лишь 21,6%.

Плоскоклеточный рак и аденокарцинома пищевода отличаются по молекулярно-биологическим и генетическим параметрам. К общим факторам риска возникновения относятся мужской пол, курение, ахалазия, низкий уровень употребления овощей и фруктов, избыточное поступление с пищей нитрозаминосоединений [4–6]. К факторам риска развития плоскоклеточного рака пищевода также относят употребление алкоголя и низкий социально-экономический статус. В свою очередь, аденокарцинома развивается у пациентов с пищеводом Барретта на фоне длительно суще-

ствующей гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и часто связана с ожирением [7–10].

Несмотря на разные клеточные источники развития плоскоклеточного рака и аденокарциномы пищевода (дисплазия многослойного плоского эпителия и дисплазия при пищеводном Барретта), общность в их канцерогенезе представляют нарушения гена *TP53* [11]. Так, мутации *TP53* обнаружены в 91% случаев плоскоклеточного рака и 69–72% случаев аденокарциномы пищевода [12–14]. Мутации гена *TP53*, по-видимому, являются иницирующими событиями канцерогенеза, так как они широко представлены как при пренеопластических изменениях многослойного плоского эпителия, так и при пищеводном Барретта (даже без дисплазии) у пациентов, у которых в дальнейшем развилась тяжелая дисплазия и аденокарцинома пищевода [11, 13, 15]. Во многих исследованиях убедительно показана связь нарушенной экспрессии p53 с наличием дисплазии и ее прогрессированием до аденокарциномы при пищеводном Барретта [16, 17]. Повышенный уровень иммуногистохимической реакции на p53 ассоциирован с более плохим прогнозом и низкой выживаемостью у пациентов с плоскоклеточным раком пищевода [18–20]. В свою очередь, при аденокарциноме пищевода aberrantная иммуногистохимическая реакция на p53 ассоциирована с более низкой общей и безрецидивной выживаемостью [21], но также и с хорошим ответом на неоадьювантную химиотерапию [22].

Инактивация гена-регулятора клеточного цикла *CDKN2A* путем мутации, делеции или эпигенетического сайленсинга выявлена в 76% случаев рака пищевода (включая и плоскоклеточные карциномы, и аденокарциномы пищевода) [12]. Отмечено усиление реакции на p16/Rb в ряду неизмененный многослойный плоский

эпителий–эзофагит–дисплазия/карцинома *in situ* многослойного плоского эпителия–плоскоклеточный рак пищевода [23]. Также выявлена aberrантная реакция на p16 при пищеводе Барретта [24]. Показано, что повышенная реакция на p16 в плоскоклеточном раке пищевода связана с более высокой общей и безрецидивной выживаемостью, чаще наблюдается на I–II стадиях заболевания и более характерна для высоко- и умереннодифференцированных опухолей [25]. Высокий индекс Ki67 и отсутствие экспрессии p16 определяют у пациентов с более низкой выживаемостью [26]. Таким образом, иммуногистохимическое исследование с маркерами p53, p16 и Ki67 дает важную информацию о степени агрессивности поведения обоих наиболее частых гистологических типов рака пищевода.

Целью нашего исследования было оценить иммуногистохимический профиль маркеров, определяющих дифференцировку и биологическое поведение плоскоклеточного рака и аденокарциномы пищевода.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (протокол № 8 от 20.10.2022). В исследование вошли 100 пациентов с морфологически подтвержденным раком пищевода. Для верификации диагноза пациентам выполнялась эзофагогастродуоденоскопия с биопсией. Биопсированные фрагменты фиксировали в 10% забуференном формалине. Материал проходил рутинную проводку, заливку в парафиновые блоки, микротомиию с толщиной срезов 3 мкм. Проводилось окрашивание гистологических срезов гематоксилином и эозином, а также реактивом Шиффа в сочетании с альциановым синим по стандартной методике. Выполнялась иммуногистохимическая реакция с маркерами p53 (D0-7, Leica Biosystems Newcastle, Великобритания), p16 (E6H4, Roche/Ventana, США), Ki67 (MM-1, Leica Biosystems Newcastle, Великобритания), CK5/6 (XM26, Leica Biosystems Newcastle, Великобритания), p63 (4A4, Roche/Ventana, США), MUC5AC (MRQ-19, Cell Marque, США), MUC6 (MRQ-20, Cell Marque, США), MUC2 (MRQ-18, Cell Marque, США). Уровень выраженности реакции на p53 оценивался по шкале IRS (immunoreactivity scale, иммунореактивная шкала), где $IRS = A \times B$, что включает анализ количества иммунопозитивных клеток (A , $\leq 10\%$ – 1 балл, 11–49% – 2 балла, 50–79% – 3 балла, $\geq 80\%$ – 4 балла) и степень интенсивности ядерного окрашивания (B , негативное окрашивание – 0, слабое окрашивание – 1, окрашивание умеренной интенсивности – 2, интенсивное окрашивание – 3) [18]. Низкий уровень выраженности реакции на p53 определялся при $IRS \leq 6$, а высокий – при $IRS > 6$. Уровень выраженности реакции на Ki67 (индекс пролиферации) оценивался как низкий при положительной

реакции в $< 30\%$ опухолевых клеток и как высокий при уровне положительной реакции в $\geq 30\%$ опухолевых клеток. Уровень выраженности реакции на p16 оценивался и в ядре, и в цитоплазме опухолевой клетки. Повышенный уровень p16 отмечался при положительной реакции в $\geq 70\%$ опухолевых клеток, очаговая реакция – при положительном окрашивании $< 70\%$ опухолевых клеток, негативным считалось полное отсутствие реакции на p16 в опухолевых клетках. Положительной реакцией на CK5/6, p63, MUC5AC, MUC6 и MUC2 считалась при относительном числе окрашенных клеток $> 1\%$. Статистическая обработка проводилась с использованием критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

В исследование вошли 100 пациентов с раком пищевода в возрасте от 40 до 93 лет. Медиана возраста соответствовала 71,5 года [64,75–79 лет]. Соотношение мужчин и женщин составило 67 к 33 (2:1). У 40 пациентов диагностирован плоскоклеточный рак, у 53 – аденокарцинома пищевода, у семи – анапластический рак. В группе с плоскоклеточным раком и аденокарциномой пищевода относительное число пациентов с различной степенью дифференцировки опухоли значительно не отличалось ($p > 0,05$, табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование выполнено для 74 пациентов: 50 с аденокарциномой пищевода и 24 с плоскоклеточным раком пищевода (рис. 1). У всех пациентов с плоскоклеточным раком выявлена позитивная реакция к маркерам плоскоклеточной дифференцировки (CK5/6 и p63), реакция на муцины (MUC5AC, MUC6 и MUC2) была негативной. У пациентов с аденокарциномой пищевода отмечалась негативная реакция на CK5/6 и p63, а реакция на муцины распределялась следующим образом: на MUC5AC выявлена у 78% пациентов, на MUC6 у 52% пациентов и на MUC2 у 38% пациентов, негативная реакция на муцины отмечена у 10% пациентов. Высокий уровень реакции на p53 (рис. 2) выявлен у 11 пациентов с плоскоклеточным

Таблица 1 | Table 1

Распределение опухолей по степени дифференцировки | Distribution of tumors based on their grade

	Плоскоклеточная карцинома Squamous cell carcinoma	Аденокарцинома Adenocarcinoma
Высокодифференцированная Well differentiated	8 (20%)	9 (16,98%)
Умереннодифференцированная Moderately differentiated	23 (57,5%)	24 (45,28%)
Низкодифференцированная Poorly differentiated	9 (22,5%)	20 (37,74%)
Всего Total	40	53

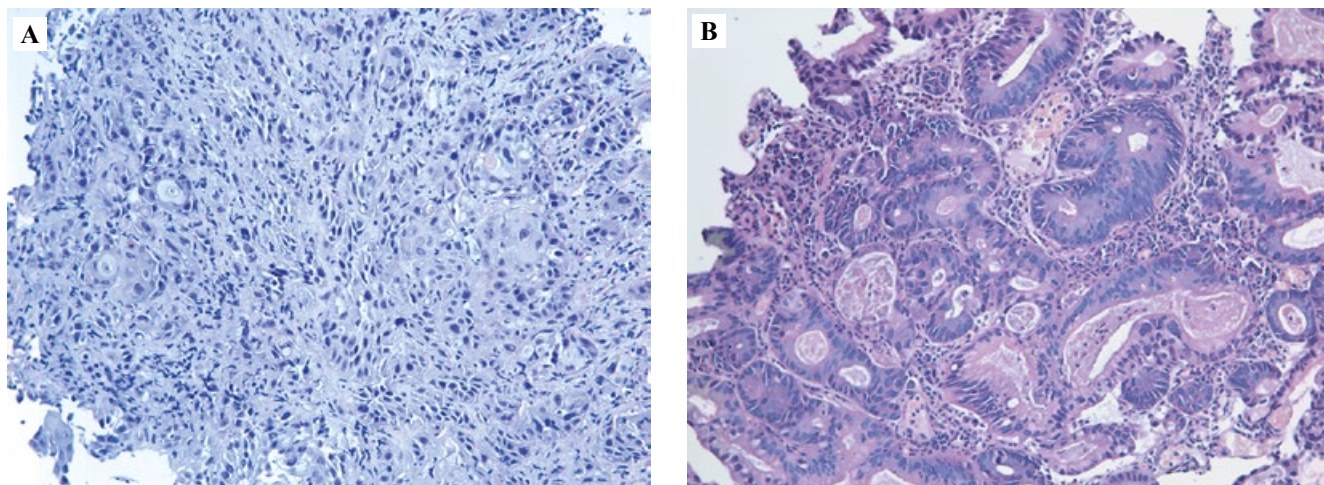


Рис. 1. А – плоскоклеточный рак пищевода, В – аденокарцинома пищевода. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$
 Fig. 1. A – squamous cell carcinoma of the esophagus, B – adenocarcinoma of the esophagus. H&E stain, $\times 200$

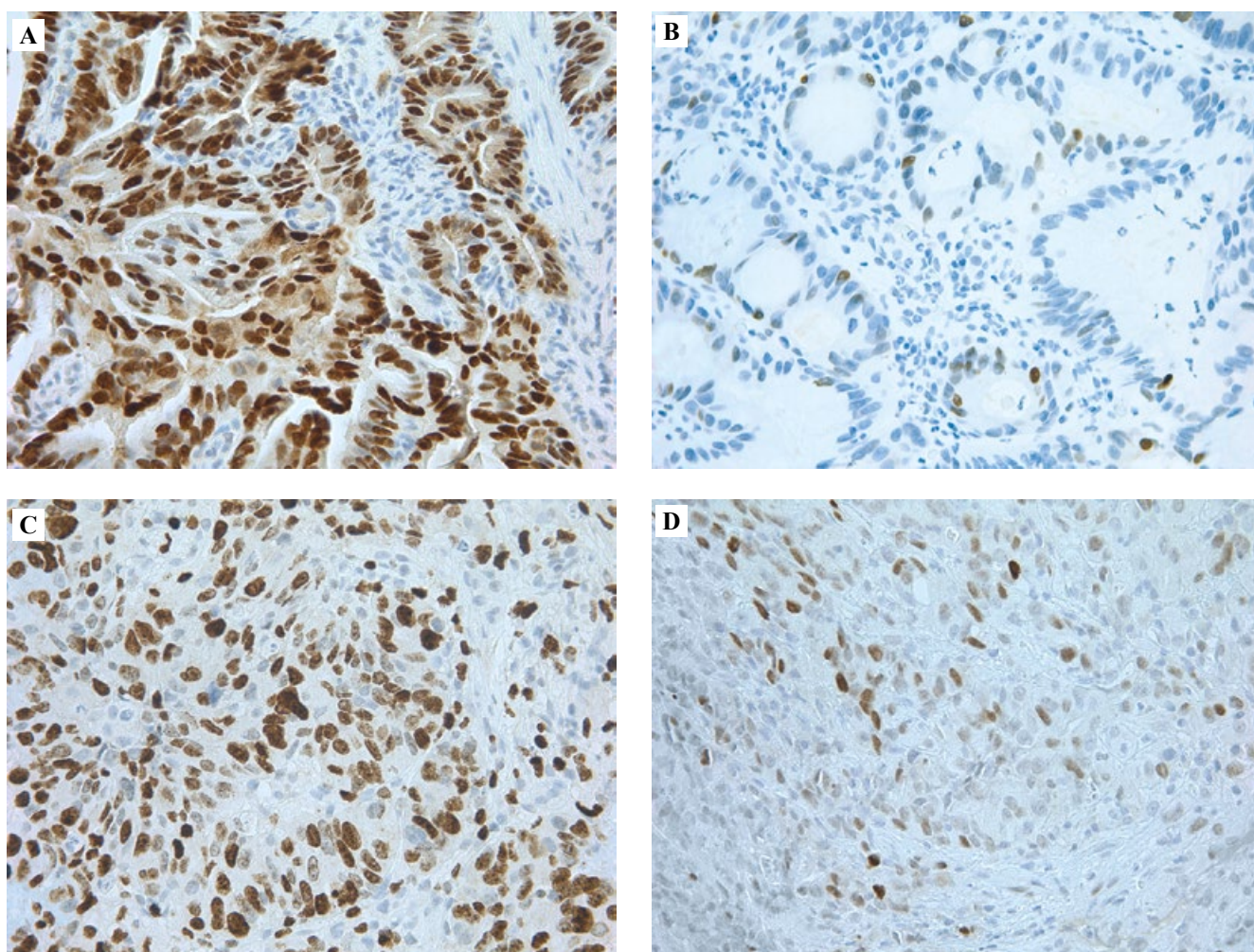


Рис. 2. А – высокий уровень выраженности реакции на p53 в аденокарциноме пищевода, В – низкий уровень выраженности реакции на p53 в аденокарциноме пищевода, С – высокий уровень выраженности реакции на p53 в плоскоклеточном раке пищевода, D – низкий уровень выраженности реакции на p53 в плоскоклеточном раке пищевода. Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 400$

Fig. 2. A – high p53 IHC expression in esophageal adenocarcinoma, B – low p53 IHC expression in esophageal adenocarcinoma, C – high p53 IHC expression in esophageal squamous cell carcinoma, D – low p53 IHC expression in esophageal squamous cell carcinoma. IHC, $\times 400$

раком пищевода (45,83%) и у 25 пациентов с аденокарциномой пищевода (50%) (различия статистически незначимые, $p>0,05$). Повышенный уровень реакции на p16 (рис. 3) отмечен у 27 пациентов с аденокарциномой пищевода (54%) и лишь у двух пациентов с плоскоклеточным раком пищевода (8,33%), полное от-

сутствие реакции на p16 не выявлено ни у одного из пациентов. В обоих типах рака пищевода повышенный уровень реакции на p16 несколько чаще встречался у пациентов с низким уровнем реакции на p53 (табл. 2), однако различия статистически незначимы. Уровень выраженности реакции на Ki67 в опухолях варьировал

Таблица 2 | Table 2

Соотношение уровня выраженности реакции на p16 и p53 в обоих гистологических типах карциномы пищевода | Correlation between p16 and p53 expression levels in both histological types of esophageal cancer

	Повышенная реакция на p16 High p16 IHC expression	Очаговая реакция на p16 Focal reaction to p16
Низкий уровень выраженности реакции на p53 Low p53 IHC expression	17	21
Высокий уровень выраженности реакции на p53 High p53 IHC expression	12	24

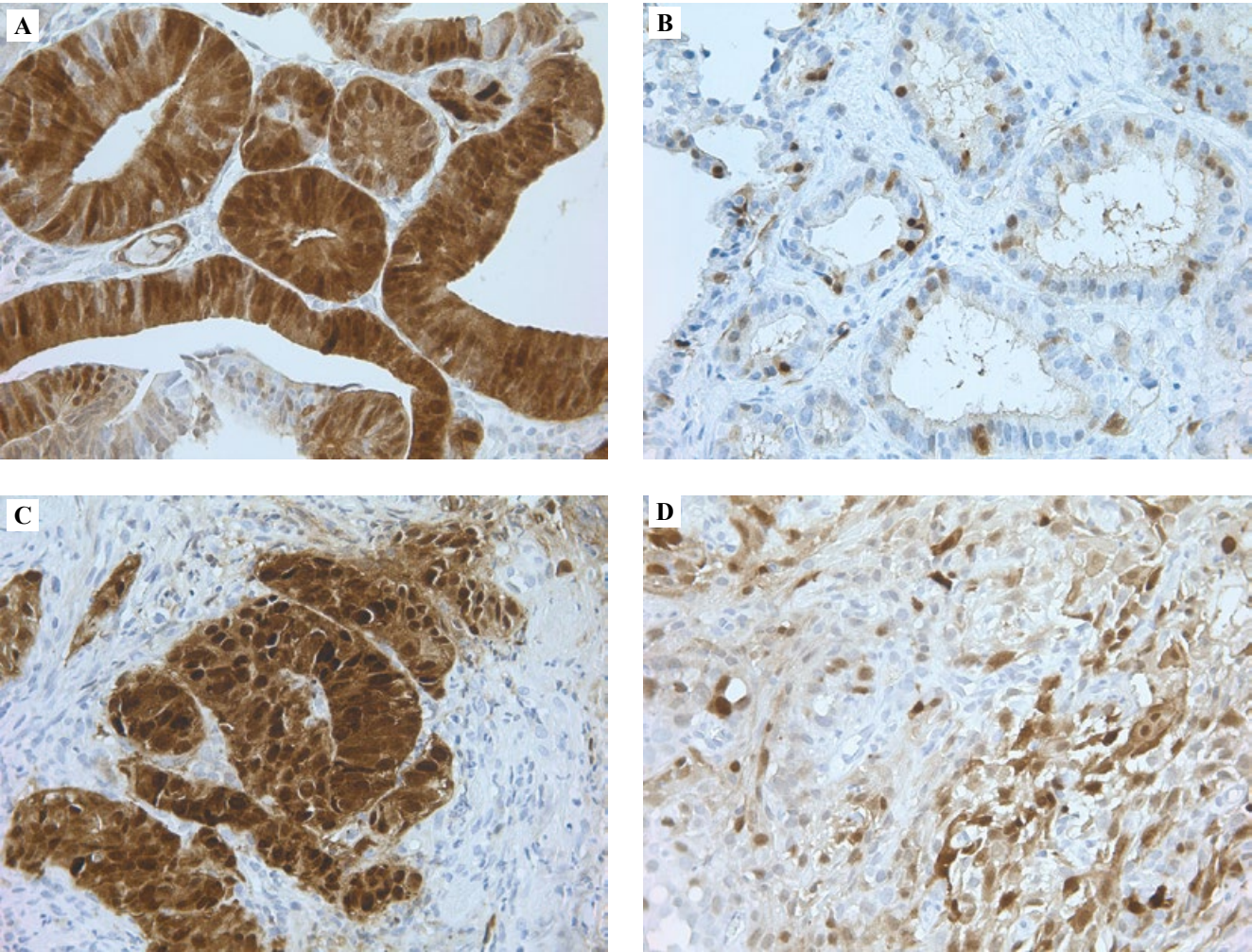


Рис. 3. А – выраженная реакция на p16 в аденокарциноме пищевода, В – очаговая реакция на p16 в аденокарциноме пищевода, С – выраженная реакция на p16 в плоскоклеточном раке пищевода, Д – очаговая реакция на p16 в плоскоклеточном раке пищевода. Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 400$
Fig. 3. A – high p16 IHC expression in esophageal adenocarcinoma, B – focal reaction to p16 in esophageal adenocarcinoma, C – high p16 IHC expression in esophageal squamous cell carcinoma, D – focal reaction to p16 in esophageal squamous cell carcinoma. IHC, $\times 400$

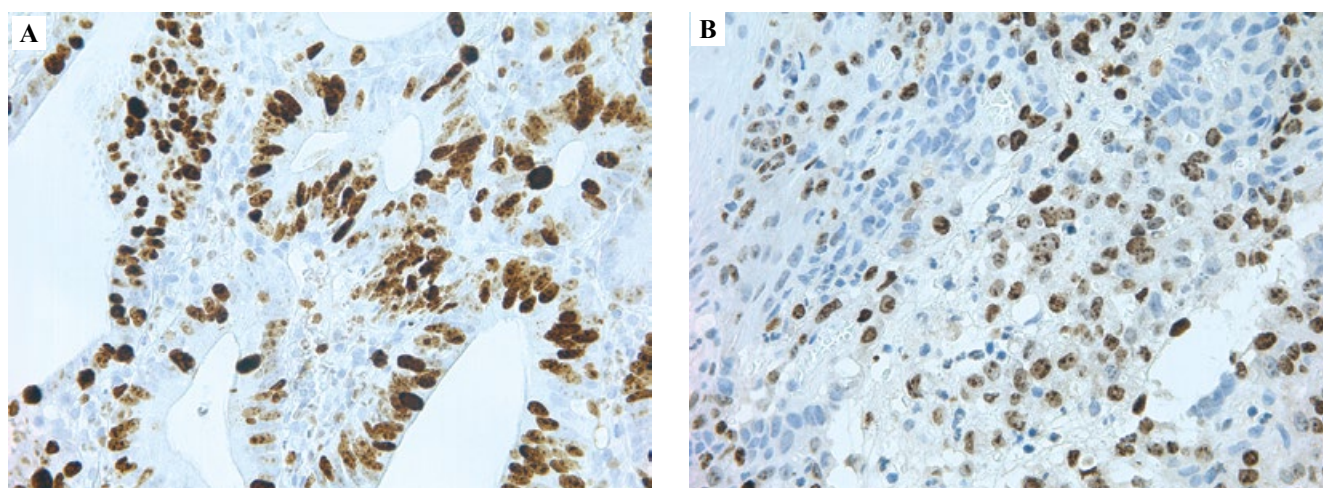


Рис. 4. А – высокий уровень реакции на Ki67 в аденокарциноме пищевода, В – высокий уровень реакции на Ki67 в плоскоклеточном раке пищевода. Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 400$

Fig. 4. A – high Ki-67 IHC expression in esophageal adenocarcinoma, B – high Ki-67 IHC expression in esophageal squamous cell carcinoma. IHC, $\times 400$

Таблица 3 | Table 3

Соотношение уровня выраженности реакции на Ki67 и p53 в обоих гистологических типах карциномы пищевода |
Correlation between Ki-67 and p53 reaction levels in both histological types of esophageal carcinoma

	Уровень реакции на Ki67 <30% Reaction to Ki-67 <30%	Уровень реакции на Ki67 $\geq 30\%$ Reaction to Ki-67 $\geq 30\%$
Низкий уровень реакции на p53 Low p53 IHC expression	12	26
Высокий уровень реакции на p53 High p53 IHC expression	2	34

от 18 до 95%. Выраженная реакция на Ki67 (рис. 4) чаще наблюдалась при высоком уровне реакции на p53 в обоих гистологических типах рака пищевода ($p < 0,01$, табл. 3).

Обсуждение

Высокий уровень выраженности реакции на p53 выявлен нами в 45,83% случаев плоскоклеточного рака пищевода и 50% наблюдений аденокарциномы, что подтверждает важную роль белка p53 и гена *TP53* в канцерогенезе разных гистологических типов рака пищевода. Так, известно, что мутации гена *TP53* являются иницирующим событием пренеопластической трансформации при пищеводе Барретта и могут выявляться у прогрессоров раньше, чем морфологическая картина дисплазии низкой степени в метаплазированном сегменте [13, 15]. Мутации гена *TP53* также представляют собой наиболее частое генетическое событие при дисплазии многослойного плоского эпителия и плоскоклеточном раке пищевода [11]. Потеря контроля над репарацией ДНК и апоптозом в результате нарушения функции и проявление различных про-онкогенных эффектов мутантного белка p53 [27] зна-

чительно ускоряют злокачественную трансформацию и онкогенез в пищеводе. Вместе с тем высокий уровень реакции на p53 связан с более низкой выживаемостью при плоскоклеточном раке и аденокарциноме пищевода [18, 19, 21].

Мутации гена *CDKN1A* также довольно распространены как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме пищевода [12]. Повышенная реакция на продукт этого гена p16 связана с более низкой стадией плоскоклеточной карциномы и более высокой выживаемостью [25]. При этом в отличие от плоскоклеточного рака шейки матки, а также головы и шеи связь между экспрессией p16 и выявлением вируса папилломы человека в плоскоклеточной карциноме пищевода убедительно не показана [28]. Согласно другим работам, вирус папилломы человека может играть роль в развитии плоскоклеточной карциномы пищевода [29]. В то же время есть данные, которые отрицают связь выявления данной инфекции и повышенной реакции на p53 и p16 с прогнозом плоскоклеточного рака пищевода [28, 30].

В нашем исследовании повышенная реакция на p16 преобладала при аденокарциноме пищевода и тенденционно выявлялась чаще при низком уровне выражен-

ности реакции на p53 в обоих гистологических типах рака пищевода. Полная потеря реакции на p16 нами не обнаружена. По данным литературы, потеря реакции на p16 и высокий индекс пролиферации связаны с плохим прогнозом обоих гистологических типов рака пищевода [26]. Высокий индекс пролиферации в нашем исследовании был связан с высоким уровнем выраженности на p53. Таким образом, иммуногистохимическое исследование с маркерами p53, p16 и Ki67 имеет прогностическую ценность при обоих наиболее частых гистологических типах рака пищевода. При этом требуется проведение дальнейших, в том числе проспективных, исследований для более глубокого изучения прогностических факторов при раке пищевода.

Заключение

Определение экспрессии иммуногистохимических маркеров p53, p16 и Ki67 в аденокарциноме и плоскоклеточном раке пищевода представляет ценность для установления прогноза заболевания.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, К.С. Масленкина.

Сбор и обработка материала – К.С. Масленкина, М.С. Наumenko, М.Ю. Гушин, В.В. Печникова, А.С. Конторщиков, К.Ю. Мидибер, А.Е. Бирюков.

Написание текста – К.С. Масленкина.

Редактирование – Л.М. Михалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, K.S. Maslenkina.

Collected the data and performed the analysis – K.S. Maslenkina, M.S. Naumenko, M.Yu. Gushchin, V.V. Pechnikova, A.S. Kontorshchikov, K.Yu. Midiber, A.E. Birukov.

Wrote the paper – K.S. Maslenkina.

Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Liu CQ, Ma YL, Qin Q, Wang PH, Luo Y, Xu PF et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040. *Thorac Cancer*. 2023;14(1):3–11. DOI: 10.1111/1759-7714.14745.
2. Morgan E, Soerjomataram I, Rumgay H, Coleman HG, Thrift AP, Vignat J et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020. *Gastroenterology*. 2022;163(3):649–58.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.05.054.
3. SEER Cancer Stat Facts: esophageal cancer. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/esoph.html> (accessed 06.05.2025).
4. Jiang W, Zhang B, Xu J, Xue L, Wang L. Current status and perspectives of esophageal cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)*. 2025;45(3):281–331. DOI: 10.1002/cac2.12645.
5. Wang SM, Katki HA, Graubard BI, Kahle LL, Chaturvedi A, Matthews CE et al. Population attributable risks of subtypes of esophageal and gastric cancers in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(9):1844–52. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001355.
6. Tustumi F, Bernardo WM, da Rocha JRM, Szachnowicz S, Seguro FC, Bianchi ET et al. Esophageal achalasia: a risk factor for carcinoma. A systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2017;30(10):1–8. DOI: 10.1093/dote/dox072.
7. Antonios K, Aintabi D, McNally P, Berinstein E, Dutta P, Sampson N et al. Risk factors for the development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2025;8(3):e70168. DOI: 10.1002/cnr2.70168.
8. Ko MT, Thomas T, Holden E, Beales ILP, Alexandre L. The association between obesity and malignant progression of Barrett's esophagus: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2025;23(5):726–38.e28. DOI: 10.1016/j.cgh.2024.07.041.
9. Maslyonkina KS, Konyukova AK, Alexeeva DY, Sinelnikov MY, Mikhaleva LM. Barrett's esophagus: the pathomorphological and molecular genetic keystones of neoplastic progression. *Cancer Med*. 2022;11(2):447–78. DOI: 10.1002/cam4.4447.
10. Maslenkina K, Mikhaleva L, Naumenko M, Vandysheva R, Gushchin M, Atiakshin D et al. Signaling pathways in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9304. DOI: 10.3390/ijms24119304.
11. Liu X, Zhang M, Ying S, Zhang C, Lin R, Zheng J et al. Genetic alterations in esophageal tissues from squamous dysplasia to carcinoma. *Gastroenterology*. 2017;153(1):166–77. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.033.
12. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature*. 2017;541(7636):169–75. DOI: 10.1038/nature20805.
13. Weaver MJ, Ross-Innes CS, Shannon N, Lynch AG, Forshaw T, Barbera M et al. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet*. 2014;46(8):837–43. DOI: 10.1038/ng.3013.
14. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet*. 2013;45(5):478–86. DOI: 10.1038/ng.2591.
15. Stachler MD, Camarda ND, Deitrick C, Kim A, Agoston AT, Odze RD et al. Detection of mutations in Barrett's esophagus before progression to high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155(1):156–67. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.03.047.
16. Duits LC, Lao-Sirieix P, Wolf WA, O'Donovan M, Galeano-Dalmau N, Meijer SL et al. A biomarker panel predicts progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2019;32(1):doy102. DOI: 10.1093/dote/doy102.
17. Choi Y, Bedford A, Pollack S. The aberrant expression of biomarkers and risk prediction for neoplastic changes in Barrett's esophagus-dysplasia. *Cancers (Basel)*. 2024;16(13):2386. DOI: 10.3390/cancers16132386.

18. Sankalecha TH, Gupta SJ, Gaikwad NR, Shirole NU, Kothari HG. Yield of p53 expression in esophageal squamous cell cancer and its relationship with survival. *Saudi J Gastroenterol*. 2017; 23(5):281–6. DOI: 10.4103/sjg.SJG_56_17.
19. Ye J, Zhang L, Li Z, Lin R, Song Y, Ni H et al. High expression of MDM2 and the p53 protein is predictive biomarkers for poor prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2021;13:2733–44. DOI: 10.2147/CMAR.S280326.
20. Jin Y, Zhao X, Song X, Wang R, Fan Z, Wang P et al. The high expression of p53 is predictive of poor survival rather TP53 mutation in esophageal squamous cell carcinoma. *J Oncol*. 2023;2023:3801526. DOI: 10.1155/2023/3801526.
21. Ten Kate FJC, Suzuki L, Dorssers LCJ, Dinjens WNM, Jones DTW, Nieboer D et al. Pattern of p53 protein expression is predictive for survival in chemoradiotherapy-naïve esophageal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(61):104123–35. DOI: 10.18632/oncotarget.22021.
22. van Olphen SH, Biermann K, Shapiro J, Wijnhoven BP, Toxopeus EL, van der Gaast A et al. P53 and SOX2 protein expression predicts esophageal adenocarcinoma in response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg*. 2017;265(2):347–55. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001625.
23. Müller LB, Meurer L, Lopes AB, Antunes LC, Vanazzi S, Fagundes RB. Stepwise expression of CDKN2A and RB1 proteins in esophageal mucosa from patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(9):669–73. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000011.
24. Shi XY, Bhagwadeen B, Leong AS. p16, cyclin D1, Ki-67, and AMACR as markers for dysplasia in Barrett esophagus. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(5):447–52. DOI: 10.1097/PAI.0b013e318168598b.
25. Wang L, Li J, Yu X, Zhang Z, Pang L, Li S et al. Prognostic significance of overexpressed p16(INK4A) in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Biomark Med*. 2016;10(5):537–46. DOI: 10.2217/bmm-2015-0057.
26. Jacobsen F, Kohsar J, Gebauer F, Kluth M, Hube-Magg C, Simon R et al. Loss of p16 and high Ki67 labeling index is associated with poor outcome in esophageal carcinoma. *Oncotarget*. 2020;11(12):1007–16. DOI: 10.18632/oncotarget.27507.
27. Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget*. 2018;9(22):16234–47. DOI: 10.18632/oncotarget.24611.
28. Pastrez PRA, Mariano VS, da Costa AM, Silva EM, Scapulatempo-Neto C, Guimarães DP et al. The relation of HPV infection and expression of p53 and p16 proteins in esophageal squamous cells Carcinoma. *J Cancer*. 2017;8(6):1062–70. DOI: 10.7150/jca.17080.
29. Zhao H, Wei Y, Zhang J, Zhang K, Tian L, Liu Y et al. HPV16 infection promotes the malignant transformation of the esophagus and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *J Med Virol*. 2023;95(10):e29132. DOI: 10.1002/jmv.29132.
30. da Costa AM, Fregnani JHTG, Pastrez PRA, Mariano VS, Silva EM, Neto CS et al. HPV infection and p53 and p16 expression in esophageal cancer: are they prognostic factors? *Infect Agent Cancer*. 2017;12:54. DOI: 10.1186/s13027-017-0163-4.

Информация об авторах

Ксения Сергеевна Масленкина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии 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.

Максим Сергеевич Науменко – аспирант по специальности «патологическая анатомия» НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Михаил Юрьевич Гущин – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

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

Андрей Сергеевич Конторщикова – 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 патоморфологических и иммуногистохимических исследований 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 Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Андрей Евгеньевич Бирюков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Ksenia S. Maslenkina – 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/0000-0001-8083-9428>

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>

Maxim S. Naumenko – Postgraduate Student in Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0009-0007-9071-1613>

Mikhail Yu. Gushchin – 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/0000-0002-1041-8561>

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

Andrey S. Kontorshchikov – 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/0000-0002-1032-0353>

Konstantin Yu. Midiber – Cand. Sci. (Med.), Head of the Group of Pathomorphological and Immunohistochemical Studies, 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>

Andrei E. Birukov – 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/0000-0001-9700-3352>

Морфофункциональные особенности плаценты пациенток с гестационным сахарным диабетом после экстракорпорального оплодотворения

К.Ш. Балабанова¹, Н.А. Махукова¹, Г.С. Дзюба¹, Ф.Ф. Бурумкулова¹,
К.В. Краснопольская¹, И.В. Баринава^{1,2}, Р.Г. Шмаков¹, Т.С. Коваленко¹

¹ ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии имени академика В.И. Краснопольского Минздрава Московской области, Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Введение. С увеличением числа программ экстракорпорального оплодотворения актуальным стал вопрос о его влиянии и влиянии гестационного сахарного диабета на морфофункциональные особенности плацент. Целью исследования является выявление морфологических особенностей плацент при гестационном сахарном диабете после экстракорпорального оплодотворения в зависимости от способа компенсации данного состояния.

Материалы и методы. Проведено морфологическое исследование 63 плацент (41 плацента пациенток с гестационным сахарным диабетом, у 29 из них методом компенсации была диетотерапия, у 12 – инсулинотерапия; 22 плаценты пациенток без него) от одноплодной доношенной беременности после экстракорпорального оплодотворения, включающее в себя макроскопическое и микроскопическое описание согласно современной международной морфологической классификации повреждений плаценты. Статистический анализ проводился на языке R version 4.4.2 с использованием пакетов прикладных программ.

Результаты. Масса плаценты в группе с гестационным сахарным диабетом оказалась достоверно меньше, чем в группе сравнения ($p=0,031$). При изучении морфологических особенностей плаценты у пациенток после экстракорпорального оплодотворения с гестационным сахарным диабетом и без него не получено статистически значимых различий. При оценке массы плаценты по перцентильной шкале МОНИИАГ выявлено, что гестационный сахарный диабет на инсулинотерапии ассоциирован с риском развития высокой массы плаценты.

Заключение. С учетом увеличения числа беременностей после экстракорпорального оплодотворения, осложненных гестационным сахарным диабетом, исследование морфофункциональных особенностей плацент у данной группы пациенток крайне необходимо. Нами выявлено отсутствие значимых различий в строении плацент при разных способах компенсации гестационного сахарного диабета: своевременное выявление, лечение и коррекция терапии, междисциплинарное наблюдение врачей за данной группой пациенток обеспечило нормальное функционирование плаценты и, как результат, отсутствие перинатальных осложнений у изучаемых групп.

Ключевые слова: плацента, гестационный сахарный диабет, экстракорпоральное оплодотворение

Для корреспонденции: Кристина Шухратовна Балабанова. E-mail: kalseidova-k@yandex.ru

Для цитирования: Балабанова К.Ш., Махукова Н.А., Дзюба Г.С., Бурумкулова Ф.Ф., Краснопольская К.В., Баринава И.В., Шмаков Р.Г., Коваленко Т.С. Морфофункциональные особенности плаценты пациенток с гестационным сахарным диабетом после экстракорпорального оплодотворения. Клин. эксп. морфология. 2025;14(5):39–48. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.39-48.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 14.04.2025. Получена после рецензирования 12.05.2025. Принята в печать 27.06.2025.

Structural and functional features of placentas in patients with gestational diabetes mellitus after in vitro fertilization

K.Sh. Balabanova¹, N.A. Makhukova¹, G.S. Dziuba¹, F.F. Burumkulova¹,
K.V. Krasnopol'skaya¹, I.V. Barinova^{1,2}, R.G. Shmakov¹, T.S. Kovalenko¹

¹ Krasnopol'sky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. With in vitro fertilization becoming more common, studying its effect and the influence of gestational diabetes mellitus on the structural and functional features of placentas has become relevant. The research investigated morphological features of placentas in gestational diabetes mellitus after in vitro fertilization, depending on treatment modalities for diabetes mellitus.

Materials and methods. The morphological study included 63 placentas: 41 placentas from patients with gestational diabetes mellitus (29 of them were treated with diet therapy and 12 underwent insulin therapy) and 22 placentas from patients without gestational diabetes mellitus. All pregnancies were full-term singleton conceived through in vitro fertilization. The research included macroscopic and microscopic examination of placentas according to the 2014 international classification of placental lesions. Statistical analysis was performed in R version 4.4.2 using standard software packages.

Results. Placental mass in the gestational diabetes mellitus group was significantly lower than that in the comparison group ($p=0.031$). When studying the morphological features of the placenta in patients from both groups, we found no statistically significant differences. Assessment of placental mass on the percentile scale of Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology indicated that gestational diabetes mellitus treated with insulin was associated with an increased risk of high placental mass.

Conclusion. No significant differences in placental structures were observed in gestational diabetes mellitus according to treatment modality. Normal placental functioning was ensured through timely detection, appropriate treatment adjustments, and interdisciplinary medical supervision. Thus, the patients developed no perinatal complications.

Keywords: placenta, gestational diabetes mellitus, in vitro fertilization

Corresponding author: Kristina Sh. Balabanova. E-mail: kalseidova-k@yandex.ru

For citation: Balabanova K. Sh., Makhukova N.A., Dziuba G.S., Burumkulova F.F., Krasnopol'skaya K.V., Barinova I.V., Shmakov R.G., Kovalenko T.S. Structural and functional features of placentas in patients with gestational diabetes mellitus after in vitro fertilization. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):39–48 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.39-48.

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

Received 14.04.2025. **Received in revised form** 12.05.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, бесплодием страдает около 17,5% взрослого населения [1]. С каждым годом увеличивается число бесплодных пар, достигающих беременности при помощи вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Имплантация и развитие эмбриона, которые в основном зависят от формирования и функции плаценты, имеют решающее значение для успешного завершения беременности [2]. Плацента – это временный многофункциональный орган, обеспечивающий рост и развитие плода, со своей уникальной структурной особенностью, важнейшими частями которой выступают ворсинчатый хорион, базальная и хориальная пластины. Терминальные ворсины хориона представляют собой альвеолоподобные выросты зрелых промежуточных ворсин и являются результатом конечного ветвления виллезного дерева. Плацента – уникальный индикатор любого нарушения метаболизма в организ-

ме [3]. По данным разных авторов, фактор бесплодия, старший репродуктивный возраст пациенток, длительность течения бесплодия, предшествующие неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), разные генитальные и экстрагенитальные патологии служат причиной системных нарушений, приводящих к ухудшению тканевого метаболизма и кровообращения в интервиллезном пространстве [4].

Многочисленные исследования доказывают, что беременность, наступившая после ЭКО, ассоциирована с более высоким риском развития как акушерских, так и перинатальных осложнений, чем при спонтанной беременности. При использовании методов ВРТ в связи с применением большого количества гормональных препаратов (агонисты, антагонисты гонадотропин-рилизин-гормон, фолликулостимуляторы, препараты прогестерона) возникают патологические изменения в инвазии трофобласта и гравидарной перестройке материнских спиральных артерий миометрия, что

может привести к формированию плацентарной недостаточности или ранним потерям беременности [5, 6]. В работе ряда специалистов содержатся сведения об увеличении вероятности выявления воспалительных признаков и патологии пуповины у беременных после ЭКО [7].

Одно из грозных и часто встречающихся осложнений беременности – гестационный сахарный диабет (ГСД). Функционирование плаценты играет особую роль в развитии ГСД. Известно, что плацентарные гормоны – плацентарный лактоген и плацентарный гормон роста, хорионический гонадотропин человека, прогестерон, кортизол, соматотропный гормон, глюкагон – важные этиопатогенетические элементы с диабетогенным потенциалом. Плацентарный гормон роста – полипептидный гормон, синтезируемый в синцитиотрофобласте плаценты с 13-й по 20-ю неделю гестации. Его прямое и опосредованное действие как основного регулятора инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) ограничено тканями материнской и плодовой части плаценты. ИФР-1 контролирует рост и адекватное кровоснабжение плаценты для создания состояния физиологической инсулинорезистентности, снижения потребления глюкозы матерью и передачи ее плоду с целью обеспечения его роста и развития [8]. Плацентарные гормоны наряду с увеличением выработки противовоспалительных цитокинов поддерживают характерное для ГСД низкодифференцированное воспалительное состояние, которое является причиной морфологических и функциональных изменений в плаценте. Размер плаценты, сосудистые поражения, микроскопический некроз могут приводить к нарушению регуляции кровообращения в системе мать–плацента–плод и ряду перинатальных осложнений, таких как макросомия, малый для гестационного возраста вес плода. Согласно А.Л. Шкляру и соавт. [9], малый для гестационного возраста плод – плод с предполагаемой массой <10 перцентиля.

В литературе данные о патоморфологических особенностях плацент у пациенток после ЭКО с наличием ГСД при разных способах его компенсации крайне ограничены. Знание этих особенностей позволит обеспечить в дальнейшем значительное улучшение диагностики, профилактики, терапии и, как следствие, акушерских и перинатальных исходов у данной категории пациенток.

Цель исследования – выявить морфологические особенности плаценты при ГСД после ЭКО в зависимости от способа компенсации сахарного диабета.

Материалы и методы

Исследование проведено после утверждения на заседании независимого локального этического комитета при Московском областном научно-исследовательском институте акушерства и гинекологии им. академика В.И. Краснопольского (МОНИИАГ) (протокол № 9 от 17.12.2021). Всеми участницами было подписано

добровольное информированное согласие. Проведено морфологическое исследование 63 плацент от одноплодной доношенной беременности после ЭКО. Морфологическое исследование плацент проводилось по стандартной методике, включало макроскопическое и микроскопическое описание согласно современной международной морфологической классификации повреждений плаценты (2014) [10]. В работе использовался микроскоп Nikon 4N75 (Nikon Imaging Company, Япония) с 5-мегапиксельной фотокамерой, оснащенный базовой программой обеспечения NIS-Elements D 5.20.00.

Исследуемые плаценты были поделены на две группы: в 1-ю вошла 41 плацента пациенток после ЭКО с ГСД, 29 из которых были на диетотерапии и 12 на инсулинотерапии, во 2-ю – 22 плаценты пациенток после ЭКО без ГСД (группа сравнения). Диагноз «гестационный сахарный диабет» устанавливался по критериям исследования НАРО (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes, гипергликемия и неблагоприятные исходы беременности) согласно действующим клиническим рекомендациям «Гестационный сахарный диабет» 2024 года [11].

Статистический анализ проводили на языке R version 4.4.2 с использованием интерпретатора RStudio 2024.12.0.467 (Posit PBC, США) и пакетов readxl, dplyr, tidyr, tibble, stats, knitr, kableExtra, ggplot2, gtsummary, forestmodel, survminer, survival, tidyverse. Проверка на нормальность распределения выполнялась с помощью теста Шапиро–Уилка, нормально распределенные данные представлены в формате mean±sd, данные, не удовлетворяющие условиям нормального распределения, – в формате median (Q1; Q3). Сравнение двух групп по количественным признакам при нормальном распределении осуществлялось с помощью Т-критерия Стьюдента, в ином случае – с помощью критерия Манна–Уитни. Отличия исследуемых параметров определяли с помощью критерия Вилкоксона (статистически значимом при $p < 0,05$). Для исследования различий в плацентах по перцентильным шкалам проведен пост-хок анализ методом Фишера с поправкой Бонферрони.

Результаты

Для исследуемых групп проведена оценка массы плацент, рассчитан плацентарно-плодовый коэффициент (ППК) и изучено ворсинчатое дерево (табл. 1). Различали зрелое ворсинчатое дерево и нарушения развития ворсин – патологически незрелое ворсинчатое дерево и незрелое с диссоциированным созреванием ворсин хориона (рис. 1 А, В). При исследовании плацент устанавливали наличие признаков острого восходящего и хронического гематогенного инфекционно-воспалительного поражения, виллита неясной этиологии как проявления иммунного (идиопатического) воспаления. Выявляли плодные обструктивные сосудистые поражения с нарушением перфузии: облите-

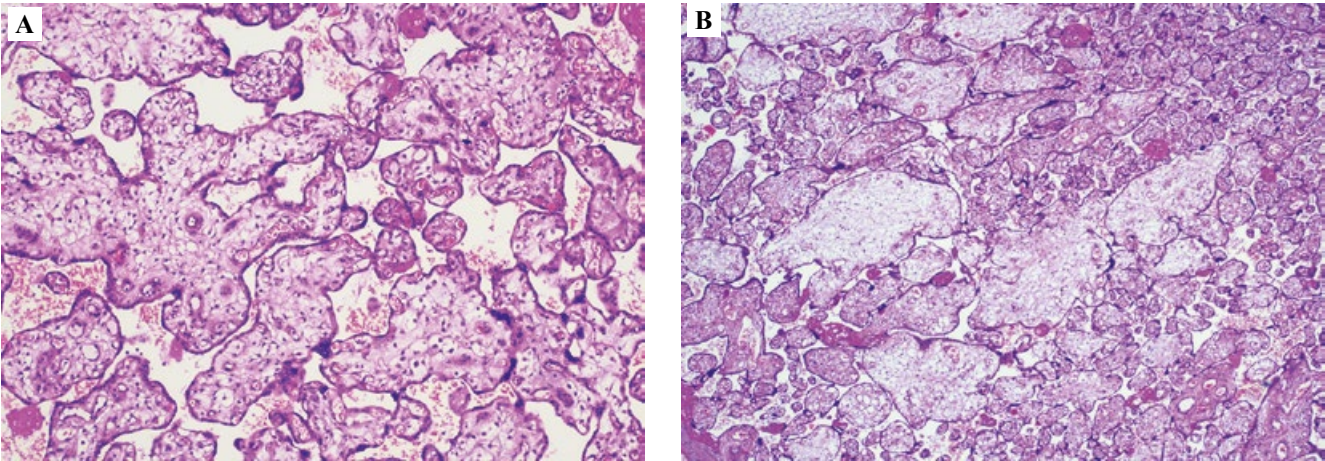


Рис. 1. Нарушение созревания ворсин в плацентах при доношенной беременности (38 и 39 недель).
А – патологическая незрелость ворсинчатого дерева, вариант недифференцированных промежуточных ворсин с ретикулярной стромой и многочисленными клетками Кашенко–Гофбауэра, ×100, В – диссоциированное созревание ворсин с чередованием терминальных, дифференцированных и недифференцированных промежуточных ворсин, ×40. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Impaired maturation of villi in placentas of full-term pregnancy (38 and 39 weeks of gestation).
А – pathological immaturity of the villous tree, characterized by undifferentiated intermediate villi with reticular stroma and numerous Kashchenko-Hofbauer cells, ×100, В – dissociated villous maturation showing alternating terminal, differentiated, and undifferentiated intermediate villi, ×40. H&E stain

Таблица 1 | Table 1

Масса, ППК и морфологические особенности плацент, n (%) | Mass, fetal/placental weight ratio (F:P), and morphological features of placentas, n (%)

Признак Feature	Группа Group		
	ЭКО с ГСД (n=41) In vitro fertilization with gestational diabetes mellitus (n=41)	ЭКО без ГСД (n=22) In vitro fertilization without gestational diabetes mellitus (n=22)	p-value
Средняя масса плаценты, г Mean placental weight, g	517,05 (±117,07)	582,14 (±108,51)	0,031
Зрелые ворсины Mature villi	41 (95,3)	19 (86,36)	1
ППК F/P ratio	0,16 (±0,03)	0,17 (±0,03)	0,155
Инфекция Infection	10 (23,26)	8 (36,36)	0,41
Виллит Villitis	4 (9,3)	3 (13,64)	0,681
Тромбоз сосудов ворсин Vascular thrombosis of the villi	11 (25,58)	8 (36,36)	0,538
Отек стромы ворсин Swelling of the stroma of the villi	19 (41,19)	8 (36,36)	0,734
Сужение межворсинчатого пространства Narrowing of the interstitial space	11 (25,58)	6 (27,27)	1
Облитерационная ангиопатия Obliterative angiopathy	23 (53,49)	11 (50)	0,997
Инфаркт Infarction	2 (4,65)	1 (4,55)	1
Ободок Ring	2 (4,65)	0	0,545

Различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) при множественных сравнениях р с помощью Т-критерия Стьюдента и Манна–Уитни | The differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) in the Multiple Comparisons p-values using the Student T-test and Mann–Whitney test

рационную ангиопатию, тромбоз, отек стромы, а также материнские сосудистые поражения – нарушения перфузии в виде сужения межворсинчатого пространства (МВП) и инфаркты ворсин. Кроме того, определяли аномалии формы плаценты и прикрепления пуповины, экстрахориальные плаценты.

Масса плаценты в группе с ГСД оказалась достоверно меньше, чем в группе сравнения ($p=0,031$), что является показателем своевременного выявления и компенсации ГСД, так как увеличение массы плаценты может свидетельствовать о дисфункции этого провизорного органа. Однако в исследовании А.В. Мурзина и соавт. [12] в 2024 году при анализе массы плацент выявлено, что при беременности после ВРТ, осложнившейся ГСД, масса плаценты больше, чем при беременности после ВРТ без ГСД.

При оценке массы плацент была использована перцентильная шкала МОНИИАГ (2010) [13]. Результаты представлены в таблице 2. Низкая масса плаценты (11–24П, где П обозначает перцентильный уровень) встречалась у девяти пациенток (у восьми на диетотерапии и у одной без ГСД), плацента нормальной массы (25–75П) – у 24 (четыре находились на инсулинотерапии, 14 на диетотерапии, шесть – без ГСД), плацента высокой массы (76–89П) – у 13 (три от пациенток на инсулинотерапии, две – от пациенток на диетотерапии, восемь – без ГСД), плацентомегалия (≥ 90 П) наблюдалась у 17 пациенток (на диетотерапии находились пять, на инсулинотерапии пять, без ГСД семь). Гипоплазия плаценты (≤ 10 П) не выявлена.

При анализе абсолютных показателей массы исследуемых плацент не получено статистически значимых различий по способу терапии ($p>0,05$). Средняя масса плаценты у пациенток на диетотерапии составила 531,75 г. ($\pm 122,86$), на инсулинотерапии – 571,42 г. ($\pm 87,50$). ППК в группе ЭКО с ГСД на диетотерапии – 0,16 [0,14; 0,18], на инсулинотерапии – 0,16 [0,16; 0,19]. Однако при оценке влияния метода терапии ГСД на массу плаценты по перцентильной шкале получены значимые различия, $p=0,014$. Выявлено, что ГСД на инсулинотерапии ассоциирован с риском развития высокой массы плаценты 76–89П (отношение шансов (ОШ) 0,15, 95% доверительный интервал (ДИ) 0,04–0,49, $p=0,002$).

В нашем исследовании фиброзные изменения стромы ворсин при ГСД на диетотерапии наблюдались в 75,5% случаев, при инсулинотерапии – в 100%. Облитерация стволочных артерий при диетотерапии отмечалась в 47,17% случаев, при инсулинотерапии – в 75%. Сужение МВП при ГСД на диетотерапии отмечено в 24,53% случаев, на инсулинотерапии – в 33,33%. Патология плаценты, характеризующаяся обилием капилляров в строме ворсин хориона (хорангиоз), обнаружена в плацентах двух пациенток с ГСД на диетотерапии. Значимых изменений в плаценте в зависимости от способа терапии ГСД не получено, все дети родились в удовлетворительном состоянии, нежелательные явления не отмечены. По данным Э.К. Айламазяна и соавт. [10], при ГСД на инсулинотерапии замечено несоответствие строения плацент с преобладанием

Таблица 2 | Table 2

Масса плацент по перцентильной шкале МОНИИАГ (2010), n, % | Placental mass on a percentile scale of Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology (2010), n, %

Группа Group	Масса Weight							
	нормальная (25–75П) normal (P25–75)		низкая (11–24П) low (P11–24)		высокая (76–89П) high (P76–89)		плацентомегалия (≥ 90 П) placentomegaly ($\geq P90$)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ГСД, диета, n=29 GDM, diet therapy, n=29	14	48,3	8	27,6	2	6,9	5	17,2
ГСД, инсулин, n=12 GDM, insulin therapy, n=12	4	33,3	0	0	3	25	5	41,7
ЭКО без ГСД, n=22 IVF without GDM, n=22	6	27,3	1	4,5	8	36,4	7	31,8
p-value	0,014							

Различия статистически значимы ($p\leq 0,05$) при множественных сравнениях p с помощью пост хок анализа методом Фишера с поправкой Бонферрони | The differences are statistically significant ($p\leq 0,05$) in the Multiple Comparisons p values using post hoc Fischer analysis with Bonferroni correction

GDM – gestational diabetes mellitus, IVF – in vitro fertilization

промежуточного типа ворсин, склероз и фиброз стромы створчатых ворсин, спазм и облитерация створчатых артерий, сужение и массивное отложение фибриноида в МВП и более частые признаки субкомпенсированной плацентарной недостаточности.

Двулолевая плацента была выявлена у двух пациенток в группе ЭКО без ГСД и у одной пациентки с ГСД на диетотерапии. То же касалось добавочной доли плаценты. Абсолютная короткость пуповины наблюдалась у двух пациенток в группе ЭКО без ГСД. Длинная пуповина встречалась в одном случае в группе ЭКО без ГСД и в одном при ГСД на диетотерапии; тощая пуповина – у одной пациентки при ГСД на диетотерапии. Краевое прикрепление пуповины отмечалось в четырех случаях без ГСД и в восьми при ГСД на диетотерапии. Единственная артерия пуповины была обнаружена в одном случае в группе ЭКО без ГСД. Гиперизвитая пуповина (индекс извитости $\geq 0,5$) наблюдалась у трех пациенток: одна в группе ГСД на инсулинотерапии и две в группе ГСД на диете. Гипоизвитая пуповина (индекс извитости $\leq 0,3$) обнаружена в одном случае в группе ГСД на диетотерапии. Статистически значимая разница в особенностях оболочек и пуповины в исследуемых группах не выявлена. Данные представлены в таблице 3.

Экстрахориальный тип плацентации – редкая аномалия, по информации исследования 2020 года, составляет 3,14% от всех родов, ассоциирована с преждевременными родами, маловесным к сроку гестации плодом, вращением плаценты, частичной отслойкой нормально расположенной плаценты, родовым излитием околоплодных вод, увеличением кровопотери в родах, отклонениями развития плода и пуповины, малым весом новорожденного и более высоким уровнем

перинатальных потерь [14]. В нашем исследовании экстрахориальный тип плацентации имел место у двух пациенток (4,65%) в группе ЭКО с ГСД, методом компенсации ГСД была диетотерапия. При этом масса плодов была 3860 и 3300 г, оценка состояния по шкале Апгар 8–9 баллов в обоих случаях.

Пациентки исследуемых групп были сопоставимы по возрасту. У пациенток в группе ЭКО с ГСД прегестационный индекс массы тела (25,66 кг/м² [21,60; 28,00]) был значительно выше, чем в группе сравнения (27,62 кг/м² [23,21; 31,06]), при $p=0,025$. Несмотря на многочисленные данные литературы о совместном негативном влиянии ЭКО и ГСД на развитие осложнений как у матери, так и у плода, при проведении многофакторного анализа по оценке акушерских и перинатальных патологий статистически значимые различия в группах исследуемых пациенток не выявлены ($p=0,331$).

По фактору бесплодия пациентки были разделены в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2024). Группы наблюдения были сопоставимы по причине бесплодия. В группе ЭКО без ГСД факторы бесплодия разделились следующим образом: женское бесплодие, связанное с трубным фактором (36,36%), другие формы (36,36%), женское бесплодие, связанное с мужским фактором (22,73%), женское бесплодие маточного происхождения (4,55%); в группе ЭКО с ГСД: другие формы (37,22%), женское бесплодие, связанное с маточным фактором (2,33%), женское бесплодие, связанное с мужским фактором (16,28%), женское бесплодие трубного происхождения (44,19%). Статистически значимые различия групп исследования по факторам бесплодия не получены ($p=0,888$). Данные представлены в таблице 4.

Таблица 3 | Table 3

Аномалии пуповины, n, % | Umbilical cord anomalies, n, %

Группа Group	Аномалия Anomaly											
	абсолютно короткая short		длинная long		тощая thin		краевая marginal		гиперизвитая hypercoiled		гипоизвитая hypocoiled	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ГСД, диета, n=29 GDM, diet therapy, n=29	0	0	1	3,4	1	3,4	8	27,6	2	6,9	1	3,4
ГСД, инсулин, n=12 GDM, insulin therapy, n=12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8,3	0	0
ЭКО без ГСД, n=22 IVF without GDM, n=22	2	9	1	4,5	0	0	4	18,2	0	0	0	0
p-value	0,331											

Различия статистически значимы ($p\leq 0,05$) при множественных сравнениях р с помощью Т-критерия Стьюдента и Манна–Уитни | The differences are statistically significant ($p\leq 0.05$) in the Multiple Comparisons p-values using the Student T-test and Mann–Whitney test
GDM – gestational diabetes mellitus, IVF – in vitro fertilization

Таблица 4 | Table 4

Сравнительная характеристика исследуемых групп по фактору бесплодия, % | Comparative characteristics of the groups by infertility factor, %

Группа Group	Фактор бесплодия Infertility factor			
	женское бесплодие, связанное с трубным фактором tubal factor infertility	женское бесплодие, связанное с мужским фактором female infertility related to the male factor	женское бесплодие, связанное с маточным фактором uterine factor infertility	другие формы женского бесплодия other forms of female infertility
ЭКО с ГСД, n=41 IVF with GDM, n=41	44,19	16,28	2,33	37,22
ЭКО без ГСД, n=22 IVF without GDM, n=22	36,36	22,73	4,55	36,36
p-value	0,888			

Различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) при множественных сравнениях р с помощью Т-критерия Стьюдента и Манна–Уитни | The differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) in the Multiple Comparisons p-values using the Student T-test and Mann-Whitney test
GDM – gestational diabetes mellitus, IVF – in vitro fertilization

Обсуждение

Исследования плацент у пациенток с ГСД после ЭКО при различных способах терапии ГСД немногочисленны. А.О. Celik et al. [15] в исследовании случай–контроль у 40 женщин со спонтанно наступившей беременностью выявили критически значимые функциональные и морфологические изменения в плацентах у пациенток с ГСД по сравнению с беременными без ГСД. Y.X. Li et al. [16] установили, что ГСД повышает риск неонатальной инфекции из-за воспаления и аутофагии в плаценте. Одним из самых распространенных ультразвуковых и морфологических признаков при структурном изменении плаценты является сужение МВП, которое может быть причиной плацентарной недостаточности [17].

В исследовании О.В. Косяковой и соавт. [18] при изучении морфологического строения последов у родильниц с ГСД при спонтанной беременности были выявлены различные нарушения плацентарного комплекса: при ГСД на диете имели место отклонения созревания виллезного дерева с преобладанием диссоциированных ворсин, гиперплазия промежуточных зрелых ворсин с увеличением синцитиальных узлов, пролиферация синцитиотрофобласта, полнокровие сосудов и капилляров терминальных ворсин; для ГСД на инсулинотерапии были характерны несоответствие строения плацент с преобладанием промежуточного типа ворсин, склероз и фиброз стромы стволовых ворсин, спазм и облитерация стволовых артерий, сужение и массивное отложение фибриноида в межворсинчатом пространстве и более частые признаки субкомпенсированной плацентарной недостаточности.

По данным метаанализа, проведенного S. Maroufzadeh et al., после применения программ ВРТ пациентки имели повышенный риск развития преэклампсии (ОШ 3,65, 95% ДИ 2,02–6,59), гестационной артериальной

гипертензии (ОШ 1,60, 95% ДИ 0,69–3,69), низкой для гестационного срока массы тела новорожденного (ОШ 1,36, 95% ДИ 1,19–1,55), преждевременных родов (ОШ 2,80, 95% ДИ 1,63–4,81), врожденных пороков развития (ОШ 1,3, 95% ДИ 1,1–1,5), предлежания плаценты (ОШ 1,15, 95% ДИ 0,93–1,43) и гестационного сахарного диабета (ОШ 1,53, 95% ДИ 1,39–1,69), что также отражалось на функциональных особенностях плаценты [19]. Сочетание ГСД и преэклампсии способно усугубить плацентарную недостаточность. Полученные нами результаты показывают, что, несмотря на компенсацию ГСД инсулинотерапией, масса плаценты имеет тенденцию не только к повышению ≥ 75 П, но и к плацентомегалии ≥ 90 П ($p=0,002$). Это противоречит устоявшемуся представлению, что при компенсированном диабете масса плаценты обычно не увеличена [20]. Однако структурные особенности ворсин при ГСД соответствуют таковым в плацентах при доношенных сроках беременности со зрелым ворсинчатым деревом. Избыточная масса плаценты может быть обусловлена гиперваскуляризацией, хорангиозом ворсин, но такая не выявлена при ГСД на инсулинотерапии. Хорангиоз наблюдался лишь в двух плацентах пациенток с ГСД на диетотерапии. Нормальные значения ППК при ГСД ($0,16 \pm 0,03$) свидетельствуют о соответствии массы плаценты массе новорожденного. Отек стромы ворсин констатирован практически с одинаковой частотой в плацентах пациенток с ГСД (41%) и без ГСД (36%) и не объясняет повышенную массу плаценты после ЭКО без ГСД. Таким образом, морфологические изменения ворсинчатого хориона, объясняющие плацентомегалию при компенсации ГСД инсулинотерапией, не обнаружены. Значимых патологических изменений в плаценте в зависимости от способа терапии ГСД не выявлено ($p > 0,05$). Мы полагаем, что дальнейший поиск причин плацентомегалии при

компенсированном инсулинотерапией ГСД может быть направлен на исследование уровня факторов роста, синтезируемых плацентой, в частности сосудистого эндотелиального фактора роста и плацентарного лактогена, действующего как гормон роста и приводящего к гипергликемии беременной с увеличением массы и роста плода. Кроме того, нуждаются в объяснении повышенная масса плаценты и незрелость ворсин при ЭКО у пациенток без ГСД в сравнении с пациентками с ЭКО и ГСД. При проделанной нами работе получены результаты, отличающиеся от данных литературы, что указывает на необходимость проведения крупных исследований в этой области.

Заключение

С учетом значительного увеличения числа беременностей после экстракорпорального оплодотворения, осложненных гестационным сахарным диабетом, исследование морфофункциональных особенностей плацент у данной группы пациенток крайне важно. Изучение влияния способа терапии гестационного сахарного диабета после экстракорпорального оплодотворения на строение и функционирование плаценты может стать значимым этапом в профилактике, своевременной диагностике и терапии с целью предупреждения развития акушерских и перинатальных осложнений. Важным наблюдением является отсутствие значимых различий в строении плацент при разных способах компенсации гестационного сахарного диабета: своевременное выявление, коррекция терапии, междисциплинарное наблюдение врачей обеспечили нормальное функционирование плаценты и, как результат, отсутствие перинатальных осложнений у изучаемых групп.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.Ш. Балабанова, И.В. Барина, Ф.Ф. Бурмкулова.
Сбор и обработка материала – К.Ш. Балабанова, Н.А. Махукова, Г.С. Дзюба.
Написание текста – К.Ш. Балабанова, И.В. Барина, Ф.Ф. Бурмкулова.
Редактирование – И.В. Барина, Р.Г. Шмаков, Т.С. Коваленко.

Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – K.Sh. Balabanova, I.V. Barinova, F.F. Burumkulova.
Collected the data and performed the analysis – K.Sh. Balabanova, N.A. Makhukova, G.S. Dziuba.
Wrote the paper – K.Sh. Balabanova, I.V. Barinova, F.F. Burumkulova.
Edited the manuscript – I.V. Barinova, R.G. Shmakov, T.S. Kovalenko.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. The World Health Organization. Infertility (Electronic resource). 2024. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/infertility> (accessed 11.04.2025).

2. Искандарова А.Р., Яцук А.Г., Мусин И.И., Берг П.А., Берг Э.А., Гумерова В.А. Аномалии плацентации после применения вспомогательных репродуктивных технологий. Акушерство, Гинекология и Репродукция. 2024;18(4): 540–546. DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2024.497.
Iskandarova AR, Yashchuk AG, Musin II, Berg PA, Berg EA, Gumerova VA. Placentation abnormalities related to the assisted reproductive technologies. Obstetrics, Gynecology and Reproduction. 2024;18(4):540–546 (In Russ.). DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2024.497.
3. Капустин Р.В., Контеева Е.В., Траль Т.Г., Толибова Г.Х. Морфологическое строение плаценты при различных типах сахарного диабета. Журнал акушерства и женских болезней. 2021;70(2):13–26. DOI: 10.17816/JOWD57149.
Kapustin RV, Kopteyeva EV, Tral TG, Tolibova GK. Placental morphology in different types of diabetes mellitus. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2021;70(2):13–26 (In Russ.). DOI: 10.17816/JOWD57149.
4. Буранова Ф.Б. Актуальные аспекты этиологии, патогенеза, диагностики и лечения плацентарной недостаточности у беременных после ЭКО. Акушерство и гинекология. 2011;6:9–16. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18085344> (получено 11.04.2025).
Buranova FB. Topical aspects of the etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment of placental insufficiency in pregnant women after in vitro fertilization. Obstetrics and gynecology. 2011;6:9–16 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18085344> (accessed 11.04.2025).
5. Агаджанова А.А. Современные методы терапии больных с привычным невынашиванием беременности. Русский медицинский журнал. 2003;1:3. Доступно по адресу: https://www.rmj.ru/articles/akusherstvo/Sovremennye_metody_terapii_bolnyh_s_privychnym_nevynashivaniem_beremennosti/?ysclid=m9txa2blmu139805239# (получено 11.04.2025).
Agadzhanova AA. Modern methods of therapy for patients with habitual miscarriage. Russian Medical Journal. 2003;1:3 (In Russ.). Available from: https://www.rmj.ru/articles/akusherstvo/Sovremennye_metody_terapii_bolnyh_s_privychnym_nevynashivaniem_beremennosti/?ysclid=m9txa2blmu139805239# (accessed 11.04.2025).
6. Глуховец Б.И. Патоморфологические и гормональные критерии в диагностике причин самопроизвольных выкидышей. Архив патологии. 2001;63(5):31–36. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=14960319> (получено 11.04.2025).
Glukhovets BI. Pathomorphological and hormonal criteria in the diagnosis of spontaneous abortions causes. Archive of Pathology. 2001;63(5):31–36 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=14960319> (accessed 11.04.2025).
7. Луцай Е.Д., Митрофанова И.В., Ферхова Ю.А., Сирик Е.Н. К вопросу о морфологии плаценты человека. Оренбургский медицинский вестник. 2021;1(33):10–17. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44951619> (получено 11.04.2025).
Lutsay ED, Mitrofanova IV, Ferkhova YuA, Sirik EN. To the question about the human morphology of placenta. Orenburg Medical Herald. 2021;1(33):10–17 (In Russ.). Available from:

- <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44951619> (accessed: 11.04.2025).
8. Calvo MJ, Parra H, Santeliz R, Bautista J, Luzardo E, Villasmil N et al. The placental role in gestational diabetes mellitus: a molecular perspective. *touchREV Endocrinol.* 2024;20(1):10–18. DOI: 10.17925/EE.2024.20.1.5.
 9. Шкляр А.Л., Ткаченко Л.В., Веровская Т.А. Задержка роста плода: передовая практика по диагностике, мониторингу и лечению (клинический протокол). Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2022;19(4):170–181. DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-170-180.
Shklyar AL, Tkachenko LV, Verovskaya TA. Fetal growth restriction: best practices for diagnosis, monitoring and treatment (clinical recommendation). *Journal of Volgograd State Medical University.* 2022;19(4): 170–181 (In Russ.). DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-170-180.
 10. Э.К. Айламазян (ред.). Сахарный диабет и репродуктивная система женщины: Руководство для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 432 с.
EK Aylamazyan (ed.). *Diabetes mellitus and the female reproductive system: a guide for doctors.* Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 432 p. (In Russ.).
 11. Андреева Е.Н., Арбатская Н.Ю., Аржанова О.Н., Башмакова Н.В., Боровик Н.В., Бурумкулова Ф.Ф. и др. Клинические рекомендации «Гестационный сахарный диабет» Минздрава России. Версия 2024 года. Вестник репродуктивного здоровья. 2025;4(1):12–24. DOI: 10.14341/brh12758.
Andreeva EN, Arbatskaya NYu, Arzhanova ON, Bashmakova NV, Borovik NV, Burumkulova FF et al. Clinical recommendations “Gestational diabetes mellitus” of the Russian Ministry of Health. Version of the year 2024. *Bulletin of Reproductive Health.* 2025;4(1):12–24 (In Russ.). DOI: 10.14341/brh12758.
 12. Мурзин А.В., Мелкозерова О.А., Чистякова Г.Н., Гришкина А.А. Влияние гестационного сахарного диабета на морфофункциональное состояние плацент у пациенток после применения вспомогательных репродуктивных технологий. Мать и Дитя в Кузбассе. 2024;2(97):20–29. DOI: 10.24412/2686-7338-2024-2-20-29.
Murzin AV, Melkozerova OA, Chistyakova GN, Grishkina AA. The influence of gestational diabetes mellitus on the morpho-functional state of placentas in patients after the use of assisted reproductive technologies. *Mother and Baby in Kuzbass.* 2024;2(97):20–29 (In Russ.). DOI: 10.24412/2686-7338-2024-2-20-29.
 13. Барина И.В., Котов Ю.Б., Склярченко Г.А., Гурьева В.М., Бурумкулова Ф.Ф., Мельников А.П. и др. Диагностическая ценность массы плаценты как критерия функционального состояния фетоплацентарного комплекса. Российский вестник акушера-гинеколога. 2010;10(5):3–6. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18965846> (получено 11.04.2025).
Barinova IV, Kotov YuB, Sklyarenko GA, Guryeva VM, Burumkulova FF, Melnikov AP et al. Diagnostic value of placental mass as a criterion for the functional state of the fetoplacental complex. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist.* 2010;10(5): 3–6 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18965846> (accessed 11.04.2025).
 14. Волков А.Е., Волошин В.В. Экстрахориальная плацентация. Часть 2. Перинатальные исходы. Пренатальная диагностика. 2020;19(3):210–219. DOI: 10.21516/2413-1458-2020-19-3-210-219.
Volkov AE, Voloshin VV. Extrachorial placentation. Part 2. Perinatal outcomes. *Prenatal diagnostics.* 2020;19(3):210–219 (In Russ.). DOI: 10.21516/2413-1458-2020-19-3-210-219.
 15. Çelik AO, Günay B, Çoker GB, Ustaşioğlu FE, Ateş S, Tunçbilek N. Evaluation of placenta in patients with gestational diabetes using shear wave elastography and superb microvascular imaging. *Acta Radiol.* 2024;65(3):318–23 DOI: 10.1177/02841851231217201.
 16. Li YX, Long DL, Liu J, Qiu D, Wang J, Cheng X et al. Gestational diabetes mellitus in women increased the risk of neonatal infection via inflammation and autophagy in the placenta. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(40):e22152. DOI: 10.1097/MD.00000000000022152.
 17. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S745–76. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
 18. Косякова О.В., Назарова Е.О., Капустин П.В. Особенности морфологического строения плаценты при гестационном сахарном диабете. Журнал акушерства и женских болезней. 2016;S1(65):16–17. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28872552> (получено 11.04.2025).
Kosyakova OV, Nazarova EO, Kapustin PV. Morphological features of the placenta in gestational diabetes mellitus. *Journal of Obstetrics and Women’s Diseases.* 2016;S1(65):16–17 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28872552> (accessed 11.04.2025).
 19. Maroufizadeh S, Navid B, Alizadeh A, Amini P, Almasi-Hashiani A, Mohammadi M et al. Risk of gestational diabetes mellitus following assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis of 59 cohort studies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;34(16):2731–40. DOI: 10.1080/14767058.2019.1670790.
 20. Baergen RN. Manual of pathology of the human placenta. 2nd ed. Springer, 2011. 544 p. DOI: 10.1007/978-1-4419-7494-5.

Информация об авторах

Кристина Шухратовна Балабанова – аспирантка акушерского физиологического отделения МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Наталья Александровна Махукова – младший научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Галина Сергеевна Дзюба – научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Фатима Фархадовна Бурумкулова – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Ксения Владиславовна Краснополяская – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отделения репродуктологии МОНИИАГ им. академика В.И. Краснополяского.

Ирина Владимировна Барина – доктор медицинских наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения МОНИИАГ им. академика В.И. Краснополяского, профессор кафедры патологической анатомии РМАНПО.

Роман Георгиевич Шмаков – доктор медицинских наук, профессор, директор МОНИИАГ им. академика В.И. Краснополяского.

Татьяна Станиславовна Коваленко – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник МОНИИАГ им. академика В.И. Краснополяского.

Author information

Kristina Sh. Balabanova – Postgraduate Student, Obstetrics Physiology Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0000-0002-8581-9159>

Natalya A. Makhukova – Junior Researcher, Pathology Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0009-0007-9824-1804>

Galina S. Dziuba – Researcher, Pathology Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0009-0002-7459-4369>

Fatima F. Burumkulova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0000-0001-9943-0964>

Kseniya V. Krasnopskaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Reproductive Medicine Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0000-0002-1275-9220>

Irina V. Barinova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology; Professor, Department of Anatomic Pathology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.

<https://orcid.org/0000-0003-0447-1734>

Roman G. Shmakov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0000-0002-2206-1002>

Tatyana S. Kovalenko – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

<https://orcid.org/0000-0001-8995-6727>

Плацентарные повреждения при доношенной беременности у реконвалесцентов, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации

Е.Е. Воропаева, Э.А. Казачкова, Л.С. Ищенко, Е.Л. Казачков, А.Ю. Холопова, Т.Н. Шамаева

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

Резюме. Введение. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) во время беременности приводит к развитию плацентарной недостаточности. Сведения о выраженности плацентарных нарушений у реконвалесцентов после COVID-19, манифестировавшей на разных сроках гестации, разноречивы. Цель исследования – оценить морфологические особенности плацент при доношенной беременности у реконвалесцентов, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное когортное исследование. 80 женщин, родивших на сроке беременности 37/0–41/6 недель в период реконвалесценции после COVID-19, перенесенной в разных триместрах беременности, составили группу I. В группу сравнения вошли 30 женщин без COVID-19 в период текущей беременности, родивших в срок 37/0–41/6 недель гестации, – группа II. Изучены характер гистологических изменений и экспрессии иммуногистохимических маркеров гипоксии (индуцированный гипоксией фактор 1α, эритропоэтин) и апоптоза (Caspase-3) в плацентах.

Результаты. Плацентарные повреждения в виде материнской и фетальной мальперфузии, хронического воспаления наиболее характерны для реконвалесцентов при доношенном сроке беременности после перенесенной COVID-19 во II и III триместрах. При этом отмечается значительная выраженность и гипоксического повреждения, и активности апоптоза вне зависимости от триместра манифестации COVID-19.

Заключение. Выявленный характер плацентарных повреждений при доношенном сроке беременности демонстрирует формирование хронической плацентарной недостаточности смешанного генеза у реконвалесцентов независимо от триместра манифестации COVID-19.

Ключевые слова: беременность, новая коронавирусная инфекция, COVID-19, реконвалесценты, своевременные роды, плацентарные повреждения, гипоксия, апоптоз

Для корреспонденции: Людмила Станиславовна Ищенко. E-mail: lyudalyn@mail.ru

Для цитирования: Воропаева Е.Е., Казачкова Э.А., Ищенко Л.С., Казачков Е.Л., Холопова А.Ю., Шамаева Т.Н. Плацентарные повреждения при доношенной беременности у реконвалесцентов, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):49–59. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.49-59.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 09.06.2025. Получена после рецензирования 23.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

Placental damage in preterm pregnancy in COVID-19 survivors in different trimesters of gestation

Е.Е. Voropaeva, E.A. Kazachkova, L.S. Ishchenko, E.L. Kazachkov, A.Yu. Kholopova, T.N. Shamaeva

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Abstract. Introduction. Coronavirus disease (COVID-19) infection during pregnancy can lead to placental insufficiency. Data on the severity of placental abnormalities in COVID-19 survivors at different gestational ages remain controversial. The study aimed to evaluate the morphologic features of placentas in preterm pregnancies in COVID-19 survivors at different trimesters of gestation.

Materials and methods. A retrospective cohort study was conducted. Group I included 80 women who delivered at 37/0–41/6 weeks of gestation after recovering from COVID-19 contracted in different trimesters. Group II (control) comprised 30 women without COVID-19 during the current pregnancy who

delivered at the same gestational age. Histological changes and the expression of immunohistochemical markers of hypoxia (hypoxia-induced factor 1 α , erythropoietin) and apoptosis (Caspase-3) were studied in placental tissue.

Results. Placental damage, including maternal and fetal malperfusion and chronic inflammation, were most frequent in women who contracted COVID-19 in the second and third trimesters. Significant hypoxic damage and apoptosis activity were observed irrespective of the trimester of infection.

Conclusion. Term placentas from women who recovered from COVID-19 show features of chronic placental insufficiency of mixed origin, regardless of the gestational stage at infection.

Keywords: pregnancy, novel coronavirus infection, COVID-19, reconvalescents, timely delivery, placental damage, hypoxia, apoptosis

Corresponding author: Lyudmila S. Ishchenko. E-mail: lyudalyn@mail.ru

For citation: Voropaeva E.E., Kazachkova E.A., Ishchenko L.S., Kazachkov E.L., Kholopova A.Yu., Shamaeva T.N. Placental damage in preterm pregnancy in COVID-19 survivors in different trimesters of gestation. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):49–59 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.49-59.

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

Received 09.06.2025. **Received in revised form** 23.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

Плацента – важный орган, обеспечивающий взаимосвязь между организмом матери и плода, а также защиту плода от влияния вредных факторов, в том числе инфекций [1]. Плацентарная недостаточность влияет не только на перинатальные исходы, но и на формирование хронической патологии различных органов и систем [2].

Сегодня хорошо изучены морфологические изменения в плацентах женщин в период острой COVID-19. Описано формирование материнской и фетальной мальперфузии, тромбгеморрагических и воспалительных изменений в плаценте на фоне активной инфекции [3–5]. Сообщается о развитии плацентита SARS-CoV-2, ассоциированного с перинатальными потерями на фоне острой COVID-19 [6, 7].

Вместе с тем данные о структурных особенностях плацент пациенток в период реконвалесценции противоречивы. Некоторые авторы сообщают, что у реконвалесцентов (РК) после COVID-19, перенесенной в разные сроки гестации, наблюдаются значительные плацентарные повреждения, проявляющиеся выраженными признаками материнской и фетальной мальперфузии [8, 9]. Y.P. Wong et al. [10] в результате анализа гистологических особенностей плацент у женщин с острой COVID-19, манифестировавшей во II/III триместре (n=33), и РК (n=14, интервал от манифестации COVID-19 до родов 106,43 $\pm$ 53,18 дня), выявили, что инфаркты ворсин наблюдаются в 2,4 раза чаще в плацентах РК без статистически значимой разницы. Фетальная мальперфузия в виде аваскулярных ворсин, тромбоза сосудов плода обнаруживается в единичных случаях в обеих группах, а хорангиоз – в 1,8 раза чаще в плацентах РК без статистически значимого преобладания. Сообщается о высокой частоте гистиоцитарного интервиллусита, децидуита и виллусита в плацентах пациенток после COVID-19 [8–10].

В. Bayraz et al. [11] исследовали 67 плацент после преждевременных и своевременных родов (34,0–

41,5 недели; 39,0 $\pm$ 1,1 недели) у РК после COVID-19 (более 14 дней после положительного теста на SARS-CoV-2) в сравнении с плацентами женщин без COVID-19 (n=126). Представлены данные о статистически значимом преобладании материнской (p<0,001) и тенденции к преобладанию фетальной (p=0,051) мальперфузии. Статистических различий по воспалительным (p=0,849) и тромботическим (p=0,248) плацентарным повреждениям между группами не выявлено.

A. Dagelic et al. [12] изучали плацентарные повреждения у РК, получавших и не получавших низкомолекулярные гепарины (НМГ) в период острой COVID-19. У получавших НМГ не было выявлено статистически значимых отличий по частоте регистрации признаков материнской мальперфузии, характеру воспалительных изменений в сравнении с не получавшими НМГ независимо от триместра манифестации инфекции. В то же время фетальная мальперфузия регистрировалась статистически значимо чаще у РК после COVID-19, перенесенной во II триместре (p=0,020), и у женщин, не получавших НМГ (p=0,017).

Таким образом, полагаем, что в связи с неоднородностью имеющихся на сегодняшний день данных целесообразно дальнейшее изучение характера плацентарных повреждений у РК после COVID-19.

Цель исследования – оценить морфологические особенности плацент при доношенной беременности у реконвалесцентов, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации.

Материалы и методы

Выполнено ретроспективное когортное исследование. Проанализированы особенности акушерско-гинекологического анамнеза, соматической патологии, течения беременности и родов, перинатальных исходов, гистологические изменения в плацентах 110 пациенток, родивших на доношенном сроке гестации.

Группу I составили 80 РК после COVID-19, перенесенной в разных триместрах беременности: 1-я под-

группа – 20 женщин, перенесших COVID-19 в I триместре, 2-я подгруппа – 30 пациенток, перенесших COVID-19 во II триместре, 3-я подгруппа – 30 РК, перенесших COVID-19 в III триместре гестации. Пациентки группы I с апреля 2020 по декабрь 2021 года поступали на лечение с острой COVID-19 в COVID-госпиталь Челябинска.

Группа II – 30 женщин, не болевших COVID-19 во время текущей беременности, родивших на доношенном сроке гестации в родильном доме областной клинической больницы № 3 Челябинска с июля 2020 по февраль 2021 года.

Далее проводили углубленное морфологическое исследование плацент с оценкой уровня экспрессии иммуногистохимических (ИГХ) маркеров гипоксии (индуцированный гипоксией фактор 1 α – Hif-1 α , эритропоэтин – EPO и апоптоза – Caspase-3). С этой целью случайным способом было отобрано 60 плацент: по 15 из 1-й, 2-й, 3-й подгрупп и группы II.

Критерии включения: родоразрешение на сроке 37/0–41/6 неделя гестации, репродуктивный возраст женщины, наличие и доступность медицинской документации; дополнительно для группы I – период реконвалесценции (более 30 дней) после подтвержденной COVID-19 (U07.1) в течение текущей беременности, комплексное лечение COVID-19 в период госпитализации в зависимости от степени тяжести инфекции в соответствии с действующими методическими рекомендациями с последующим продолжением после выписки из госпиталя курса НМГ в профилактических дозах до 6 недель, приема витаминно-минеральных комплексов для беременных, содержащих витамины С, Е, D, в течение всей последующей гестации; дополнительно для группы II – отсутствие COVID-19/респираторных вирусных инфекций в течение текущей беременности, отрицательный результат обследования на SARS-CoV-2 из носоглотки на момент родов. Критерии невключения: со стороны женщины – многоплодная беременность, соматические заболевания в стадии декомпенсации, вирус иммунодефицита человека, злокачественные новообразования и психические заболевания; со стороны плода – перинатальная смерть плода/новорожденного, врожденные пороки развития.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета (протокол № 8 от 20.09.2021). Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати.

Морфологическое исследование плацент осуществляли в Челябинском областном патологоанатомическом бюро, являющемся базой кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко Южно-Уральского государственного медицинского университета. Гистологическое исследование плацент проводили на основе общепринятых методик [13, 14]. Повреждения анализировали с уче-

том классификации Amsterdam Placenta Workshop Group [14, 15]. ИГХ анализ проводили с применением системы визуализации N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI, Япония), хромогена DAB и готовых к применению кроличьих моноклональных антител (МАТ) (predilute, ready-to-use). Для исследования процессов гипоксии в плацентарной ткани применяли МАТ к Hif-1 α (клон EP118, Epitomics, США) и к эритропоэтину (EPO, Cat. № GTX112834, GeneTex Inc., США). Процессы апоптоза оценивали с использованием МАТ к Caspase-3 (клон ET 1602-39, Hangzhou Human Biotechnology Co., Ltd, Китай). Уровень выраженности реакции на ИГХ маркеры определяли путем измерения площади положительного окрашивания в цитоплазме клеток синцитиотрофобласта. Проводили сканирование каждого микропрепарата с помощью цифрового сканирующего микроскопа Hamamatsu (NanoZoomer S210, Япония). Полученные гистосканы архивировали на цифровом носителе для проведения в дальнейшем автоматизированного подсчета ИГХ-позитивных структур с применением программного обеспечения для цифрового анализа биоизображений QuPath (<https://qupath.github.io>) [16].

Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета SPSS Statistics 19 (IBM, США). Расчет количественных показателей представлен в формате Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1; Q3 – первый и третий квартили, в связи с отличием их распределения от нормального при анализе с применением критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с применением критериев Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни. Качественные параметры представляли в виде абсолютных (n) и относительных (%) частот. При анализе таблиц сопряженности использовали критерий χ^2 Пирсона или точный критерий Фишера (если нарушалось условие применения χ^2 Пирсона). Проверку статистических гипотез проводили при уровне значимости $p \leq 0,05$. При множественных парных сравнениях применяли поправку Бонферрони (заданный критический уровень значимости делили на количество пар сравнений).

Результаты

В группах исследования имели место благоприятные перинатальные исходы. Не отмечено статистически значимых различий по частоте развития плацентарной недостаточности (нарушение маточно-плацентарного кровотока 1–2-й степени и/или задержка роста плода) во время беременности – 4/20 (20,0%), 1/30 (3,3%), 4/30 (13,3%), 3/30 (10,0%) случая ($p=0,296$), дистрессу плода в родах – 1/20 (5,0%), 1/30 (3,3%), 2/30 (6,7%), 0/30 (0,0%) случаев ($p=0,703$), антропометрическим показателям (вес новорожденного – 3455 (3085; 3750), 3525 (3232; 3812), 3485 (3205; 3907), 3670 (3330; 3825) г ($p=0,525$); длина новорожденного – 51,5 (51; 53), 52 (50; 53), 53 (50,8; 54), 52 (50,8; 53,3) ($p=0,455$) см и оценке по шкале Апгар (на первой минуте – 8 (7; 8),

8 (8; 8), 8 (7; 8), 8 (7; 8) ($p=0,923$); на пятой минуте – 8 (8; 9), 9 (8; 9), 8 (8; 9), 8 (8; 9) баллов ($p=0,786$), асфиксии новорожденного – 1/20 (5,0%), 0/30 (0,0%), 1/30 (3,3%), 1/30 (3,3%) случаев ($p=0,875$) в 1–3-й подгруппах группы I и группе II, соответственно. При этом анализ результатов гистологического исследования плацент показал статистически значимое преобладание в 1–3-й подгруппах ряда признаков материнской и фетальной мальперфузии и хронического воспаления в сравнении с группой II.

Децидуальная артериопатия ($p=0,011$; $p_{1,2}=0,556$; $p_{1,3}=0,904$; $p_{1,II}=0,021$; $p_{2,3}=0,598$; $p_{2,II}=0,001$; $p_{3,II}=0,005$, нижние индексы отражают номера сравниваемых подгрупп/групп) и тромбоз сосудов ворсин ($p=0,003$; $p_{1,2}=0,064$; $p_{1,3}=0,239$; $p_{1,II}=0,171$; $p_{2,3}=0,438$; $p_{2,II}<0,001$; $p_{3,II}=0,005$) регистрировались статистически значимо чаще в плацентах пациенток 2-й и 3-й подгрупп относительно группы II, между подгруппами группы I статистически значимых различий по частоте децидуальной артериопатии не получено, однако отмечалась тенденция к тромбозу сосудов ворсин во 2-й подгруппе относительно 3-й подгруппы (рис. 1). Агглютинация ворсин ($p=0,001$; $p_{1,2}=0,529$; $p_{1,3}=0,904$; $p_{1,II}=0,007$; $p_{2,3}=0,405$; $p_{2,II}<0,001$; $p_{3,II}=0,004$) и лимфоплазмозитарный децидуит ($p=0,001$; $p_{1,2}=0,413$; $p_{1,3}=0,903$; $p_{1,II}=0,001$; $p_{2,3}=0,292$; $p_{2,II}=0,007$; $p_{3,II}<0,001$) статистически значимо преобладали во всех подгруппах группы I относительно группы II, между 1–3-й подгруппами статистически значимых различий не выявлено (рис. 1). Скопления аваскулярных ворсин наблюдали во 2-й подгруппе статистически значимо чаще относительно группы II

($p=0,011$; $p_{1,2}=0,386$; $p_{1,3}=0,240$; $p_{1,II}=0,100$; $p_{2,3}=0,015$; $p_{2,II}=0,005$; $p_{3,II}=0,999$), между подгруппами группы I статистически значимых различий не отмечено, но наблюдалась тенденция к увеличению частоты признака во 2-й подгруппе относительно 3-й подгруппы (рис. 1). Массивное отложение перивиллезного фибриноида во 2-й подгруппе отмечали статистически значимо чаще относительно группы II ($p=0,021$; $p_{1,2}=0,105$; $p_{1,3}=0,248$; $p_{1,II}=0,322$; $p_{2,3}=0,598$; $p_{2,II}=0,004$; $p_{3,II}=0,018$), между подгруппами группы I статистически значимые различия не зарегистрированы (рис. 1).

Нами не выявлено статистически значимых различий в группах исследования относительно синцитиальных узлов ($p=0,560$), полнокровия межворсинчатого пространства ($p=0,139$), тромбоза межворсинчатого пространства ($p=0,577$), гистиоцитарного интервиллусита ($p=0,625$), некроза трофобласта ($p=0,948$), нарушения созревания ворсин ($p=0,941$), отека ворсин ($p=0,277$), хорангиоза ($p=0,374$), многоочагового хорангиоматоза ($p=0,187$), гнойного децидуита ($p=0,282$), хориоамнионита ($p=0,161$), некротизирующего хориоамнионита ($p=0,249$), хориального васкулита ($p=0,550$), продуктивного villus-интервиллусита ($p=0,020$; $p_{1,2}=0,908$; $p_{1,3}=0,059$; $p_{1,II}=0,029$; $p_{2,3}=0,028$; $p_{2,II}=0,012$; $p_{3,II}=0,739$). Инфаркты ворсин не регистрировались.

Проведено углубленное морфологическое исследование плацент для оценки выраженности гипоксического повреждения и активности процессов апоптоза (рис. 2–4). Анализ полученных данных показал наличие статистически значимых различий в группах (табл.).

Таблица | Table

Уровень выраженности реакции на Hif-1 α , EPO и Caspase-3 в плацентах пациенток групп исследования, Me (Q1; Q3), %
| Expression levels of Hif-1 α , EPO, and Caspase-3 in placentas of patients, Me (Q1; Q3), %

ИГХ маркер IHC marker	Группа I Group I			Группа II Group II, n=15	p
	1-я подгруппа subgroup 1, n=15	2-я подгруппа subgroup 2, n=15	3-я подгруппа subgroup 3, n=15		
Hif-1 α	78,7 (73,1; 82,7)	69,5 (49,7; 78,4)	77,2 (66,2; 81,2)	38,1 (27,9; 54,2)	$p<0,001$; ; $p_{1,2}=0,221$; $p_{1,3}=0,663$; $p_{1,II}<0,001$; $p_{2,3}=0,206$; $p_{2,II}=0,001$; $p_{3,II}<0,001$
EPO	9,4 (4,2; 18,5)	20,9 (14,3; 36,4)	32,6 (12,9; 49,9)	3,1 (2,8; 5,6)	$p<0,001$; $p_{1,2}=0,015$; $p_{1,3}=0,004$; $p_{1,II}=0,005$; $p_{2,3}=0,310$; $p_{2,II}<0,001$; $p_{3,II}<0,001$
Caspase-3	84,3 (63,9; 87,8)	78,5 (65,9; 81,9)	73,8 (59,2; 80,1)	47,3 (28,4; 65,3)	$p=0,001$; $p_{1,2}=0,430$; $p_{1,3}=0,206$; $p_{1,II}=0,001$; $p_{2,3}=0,310$; $p_{2,II}=0,001$; $p_{3,II}=0,011$

p – уровень значимости по критерию Краскела–Уоллиса; $p_{1,2}$ – уровень значимости по критерию Манна–Уитни | p – significance level according to the Kruskal–Wallis criterion; $p_{1,2}$ – significance level according to the Mann–Whitney criterion

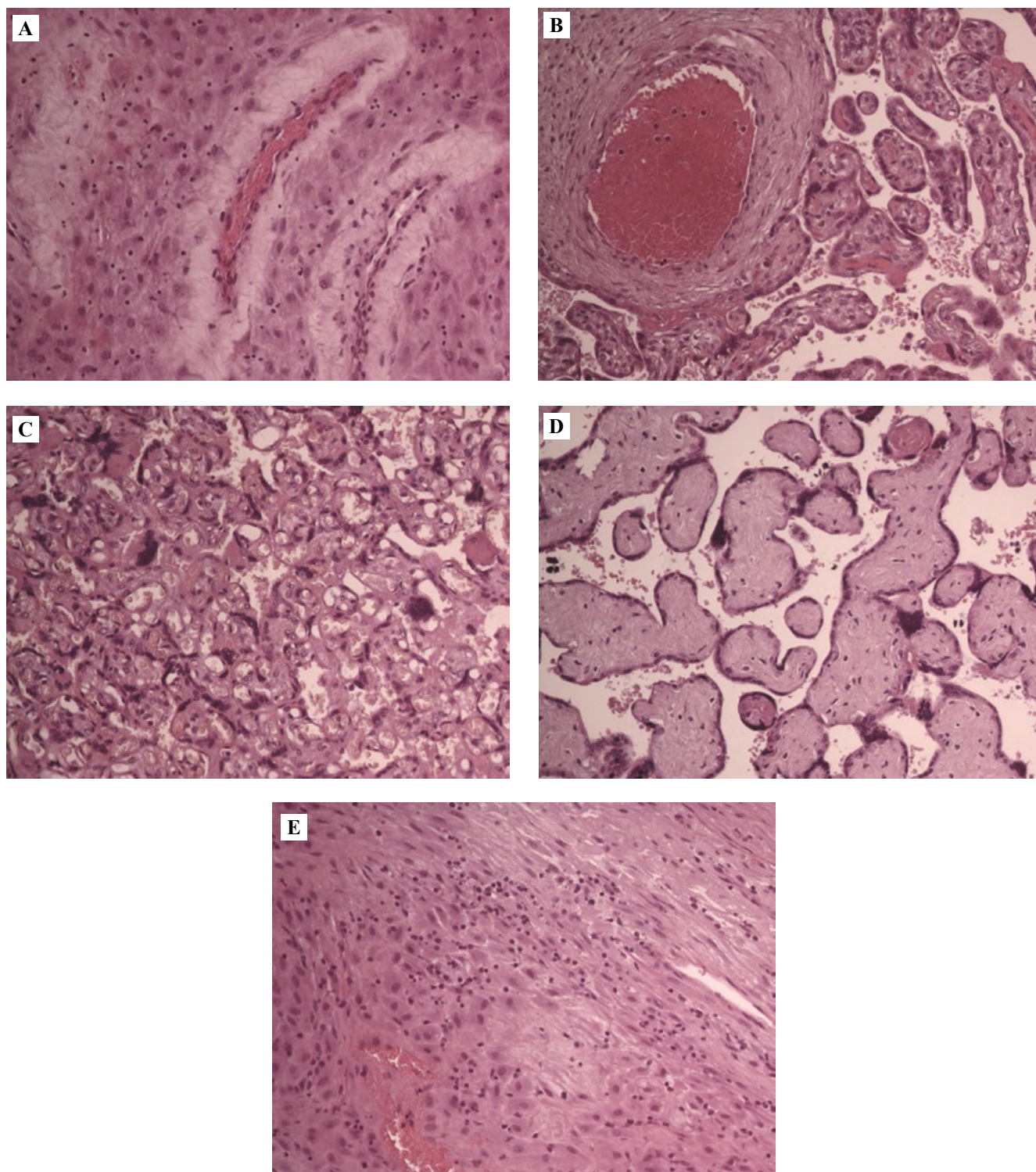


Рис. 1. Гистологические нарушения в плацентах пациенток групп исследования: децидуальная артериопатия (А), тромбоз сосудов ворсин (В), агглютинация ворсин (С), группы аваскулярных ворсин (D), лимфоплазмочитарный децидуит (Е). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 1. Histological abnormalities in placentas of patients: decidual arteriopathy (A), thrombosis of villous vessels (B), villous agglutination (C), avascular villous groups (D), lymphoplasmacytic deciduitis (E). H&E staining, $\times 200$

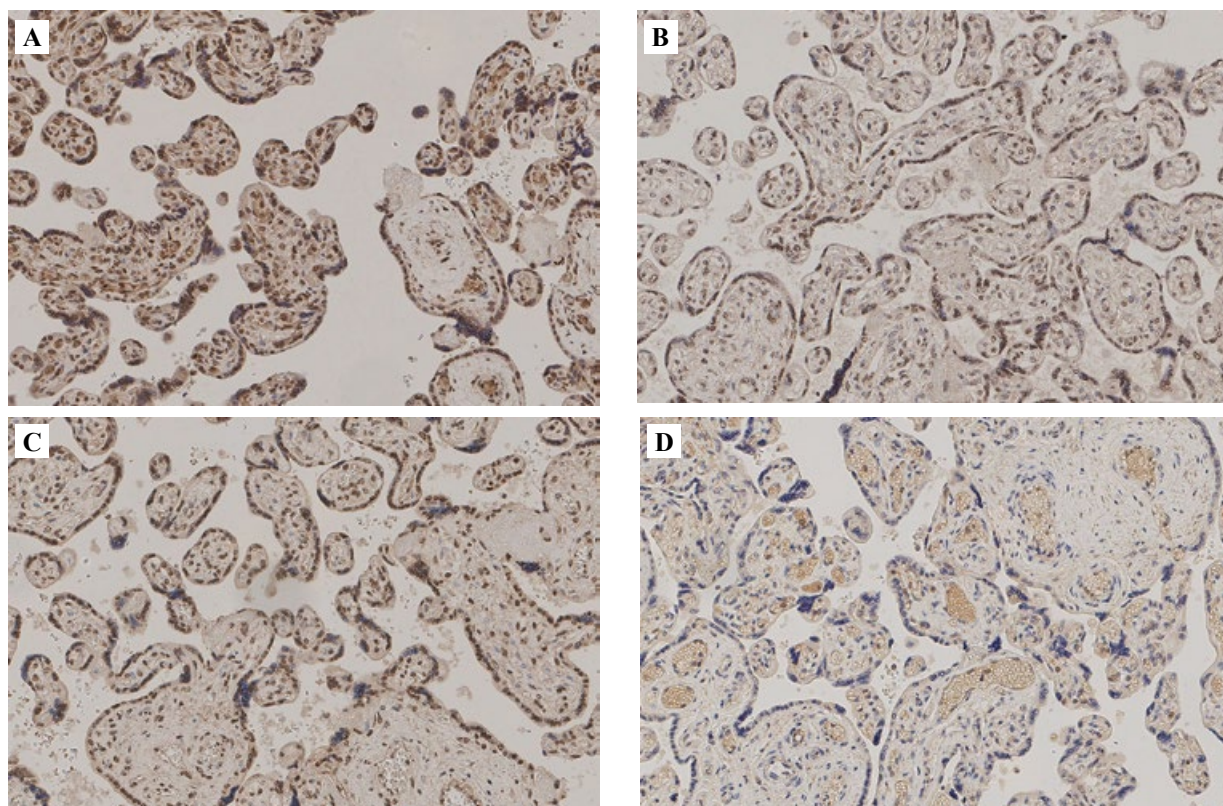


Рис. 2. Реакция на Hif-1 α в плацентах пациенток 1-й подгруппы (А), 2-й подгруппы (В), 3-й подгруппы (С), группы II (D).
Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 200$

Fig. 2. Hif-1 α expression in placentas of patients from subgroup 1 (A), subgroup 2 (B), subgroup 3 (C), and group II (D). IHC, $\times 200$

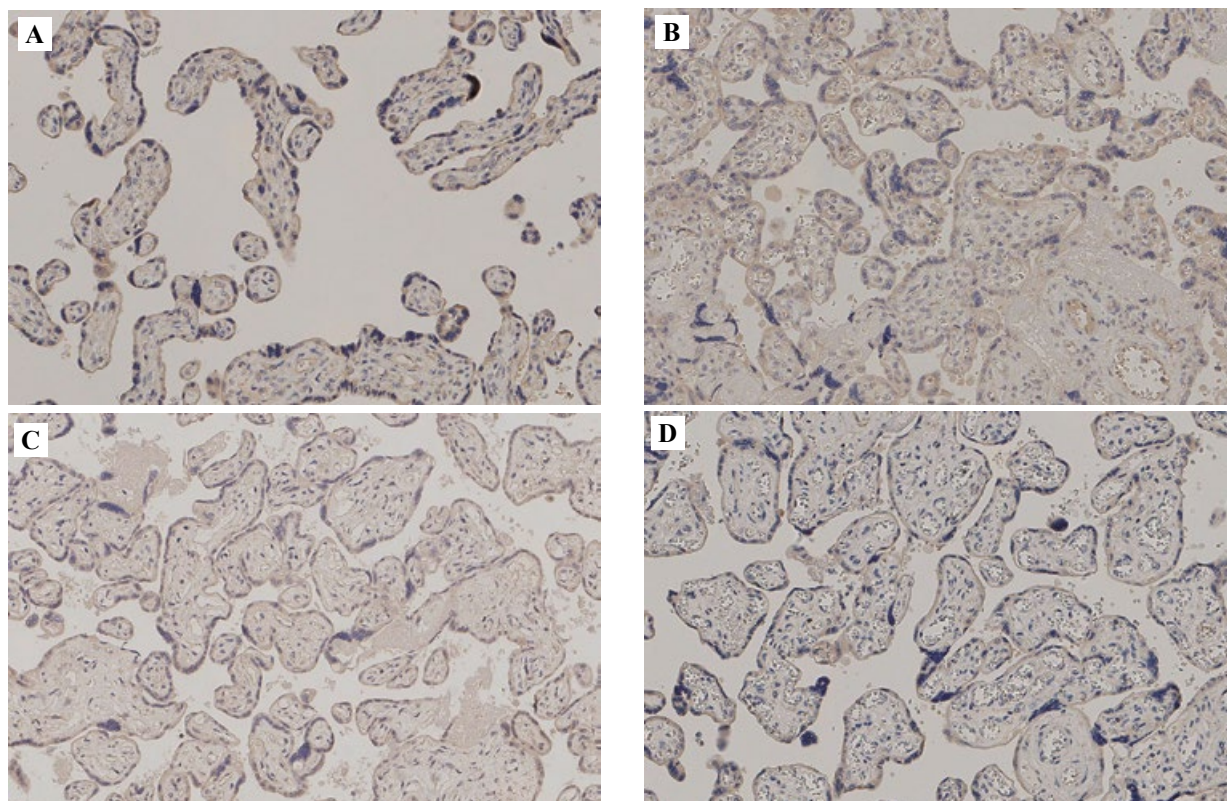


Рис. 3. Реакция на EPO в плацентах пациенток 1-й подгруппы (А), 2-й подгруппы (В), 3-й подгруппы (С), группы II (D).
Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 200$

Fig. 3. EPO expression in placentas of patients from subgroup 1 (A), subgroup 2 (B), subgroup 3 (C), and group II (D). IHC, $\times 200$

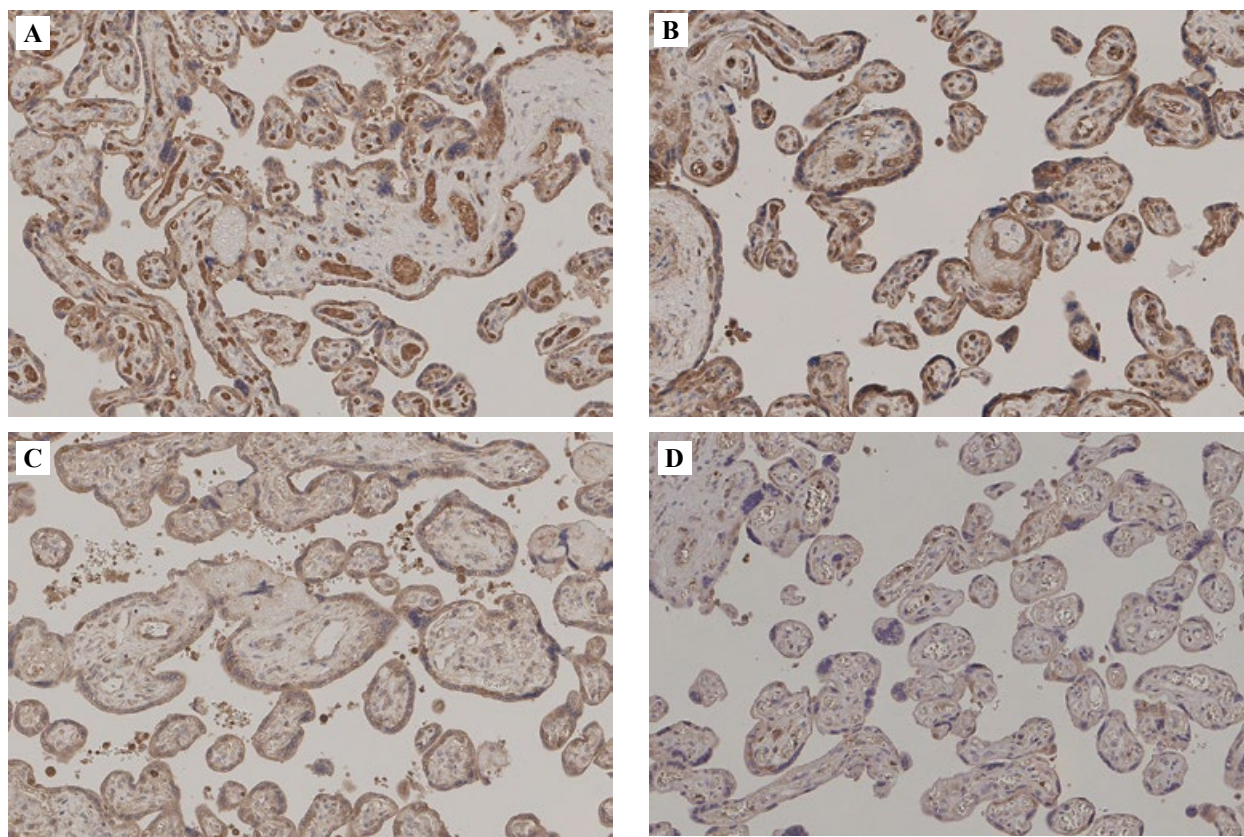


Рис. 4. Реакция на Caspase-3 в плацентах пациенток 1-й подгруппы (А), 2-й подгруппы (В), 3-й подгруппы (С), группы II (D). Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 200$

Fig. 4. Caspase-3 expression in placentas of patients from subgroup 1 (A), subgroup 2 (B), subgroup 3 (C), and group II (D). IHC, $\times 200$

Регистрировали статистически значимо более высокий уровень реакции на Hif-1 α , EPO в плацентах РК после COVID-19 независимо от триместра манифестации инфекции относительно плацент беременных без COVID-19. Уровень реакции на Caspase-3 статистически значимо преобладал в плацентах РК 1-й и 2-й подгрупп относительно группы II.

Обсуждение

Анализ полученных результатов гистологического исследования плацент демонстрирует наличие признаков хронической компенсированной плацентарной недостаточности гипоксического, тромботического и воспалительного генеза у РК, причем независимо от триместра манифестации COVID-19.

Наблюдается статистически значимое преобладание в группе РК ряда признаков материнской и фетальной мальперфузии, что частично согласуется с данными других исследований [8–11]. Децидуальная артериопатия и тромбоз сосудов ворсин статистически значимо преобладали в плацентах РК после COVID-19, перенесенной во II и III триместрах, относительно плацент женщин без COVID-19. Агглютинацию ворсин регистрировали статистически значимо чаще в плацентах РК вне зависимости от триместра манифестации COVID-19. В плацентах РК после COVID-19, перенесенной во II триместре, статистически значимо чаще

наблюдали скопления аваскулярных ворсин. В плацентах РК чаще регистрировали массивное отложение перивиллезного фибриноида, что согласуется с данными других исследований [8, 9]. Статистически значимые различия по этому признаку получены только между плацентами РК II триместра манифестации COVID-19 и плацентами пациенток без COVID-19 в анамнезе, а в плацентах РК III триместра манифестации COVID-19 наблюдали тенденцию к статистической значимости отличий.

Воспалительные изменения плаценты имели место у всех РК независимо от триместра манифестации COVID-19. Лимфоплазмочитарный децидуит регистрировали статистически значимо чаще в сравнении с плацентами пациенток без COVID-19 в анамнезе. Продуктивный виллузит выявляли без статистически значимых различий по группам исследования, но в плацентах РК с манифестацией COVID-19 в I и II триместре с тенденцией к статистически значимому преобладанию в сравнении с плацентами пациенток без COVID-19 в анамнезе. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [8–10].

Рядом исследований установлено, что SARS-CoV-2 способствует нарушению работы антиоксидантных систем, повышению уровня активных форм кислорода на фоне митохондриальной дисфункции и стимулирует окислительный стресс в тканях пациентов.

Последний усиливает продукцию провоспалительных цитокинов, провоцирует цитокиновый шторм, что сопровождается высокой экспрессией Hif-1 α , ответственного за адаптацию к тканевой гипоксии и окислительному стрессу [17, 18].

A. Rolfo et al. [19] наблюдали в плацентах пациенток с положительным тестом на SARS-CoV-2 в III триместре в сравнении с плацентами женщин без COVID-19 ультраструктурные изменения в митохондриях. Отмечено статистически значимое повышение экспрессии маркеров окислительного стресса (тиобарбитуровых кислотнo-реактивных веществ и Hif-1 α), а также активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы) при благоприятных акушерских и неонатальных исходах. По данным Е.Е. Воропаевой и соавт. [20], установлен статистически значимо более высокий уровень экспрессии Hif-1 α ($p < 0,001$) в плацентах РК после COVID-19 в сравнении с плацентами пациенток с острой COVID-19 и критическим поражением легких при преждевременных родах.

Проведенное нами исследование выявило статистически значимо более высокий уровень выраженности реакции на маркеры гипоксии Hif-1 α ($p_{1,II} < 0,001$, $p_{2,II} = 0,001$, $p_{3,II} < 0,001$) и ЕРО ($p_{1,II} = 0,005$, $p_{2,II} < 0,001$, $p_{3,II} < 0,001$) в клетках трофобласта у РК вне зависимости от триместра манифестации COVID-19 в сравнении с плацентами неболевших женщин. Это свидетельствует о сохранении гипоксических повреждений в течение длительного периода после перенесенной инфекции, нарушении плацентарного кровообращения вне зависимости от срока гестации в период острой инфекции, что и подтверждается развитием материнской и фетальной мальперфузии. Также отмечается увеличение уровня выраженности реакции на ЕРО в плацентах пациенток, перенесших COVID-19 во II ($p_{1,2} = 0,015$) и III ($p_{1,3} = 0,004$) триместрах, в 2,2 и 3,5 раза, соответственно, относительно плацент пациенток, перенесших COVID-19 в I триместре. Гипоксию любого генеза относят к факторам, стимулирующим продукцию ЕРО [21, 22]. ЕРО обладает ангиогенным, антиапоптотическим и пролиферативным действием [23, 24]. ЕРО и его рецепторы выявлены в клетках цито- и синцитиотрофобласта, эндотелиальных клетках фетоплацентарных сосудов, что предположительно свидетельствует о влиянии ЕРО на процессы пролиферации и дифференцировки клеток трофобласта плаценты [23]. ЕРО защищает ткани от метаболического стресса [25]. Статистически значимое преобладание уровня выраженности реакции на ЕРО в плацентах РК после манифестации COVID-19 в любом триместре демонстрирует активность антигипоксических и антиапоптотических процессов вне зависимости от срока гестации на момент острой инфекции.

Нами не найдено в доступной литературе сведений об исследовании процессов апоптоза на доношенном сроке в плацентах РК после COVID-19 в сравнении

с плацентами женщин без COVID-19 в течение текущей беременности. M.P. Wardhana et al. [26] установили высокую активность апоптоза в трофобласте плацент пациенток, родоразрешенных на фоне острой COVID-19 в III триместре, в сравнении с плацентами беременных без COVID-19. Не было выявлено корреляции между выраженностью апоптоза и степенью тяжести инфекции. Результаты согласуются с данными других авторов, выявивших статистически значимо более высокий уровень апоптоза ($p < 0,001$) в плацентах пациенток с острой COVID-19 в сравнении с плацентами РК после COVID-19, однако это касается только преждевременных родов [20].

Известно, что гипоксия и окислительный стресс являются индуктором активации апоптоза в тканях, в частности в ворсинах плаценты [27]. Воспалительные изменения также инициируют проапоптотический эффект [28]. В нашем исследовании об этом свидетельствует более высокий уровень выраженности реакции на Caspase-3 в плацентах РК при манифестации COVID-19 в любом триместре. Статистически значимо более высокие уровни реакции на Caspase-3 регистрируются в плацентах РК при манифестации COVID-19 в I/II триместре ($p_{1,II} = 0,001$ / $p_{2,II} = 0,001$), с тенденцией к статистически значимому увеличению уровня экспрессии Caspase-3 у РК III триместра манифестации инфекции ($p_{3,II} = 0,011$) в сравнении с плацентами пациенток без COVID-19. Высокая активность апоптоза в клетках трофобласта может способствовать нарушению процессов ангиогенеза в плаценте, что ведет к неадекватному газообмену и обмену веществ между матерью и плодом, развитию плацентарной недостаточности. Высокий уровень выраженности реакции на Caspase-3 в сочетании с высоким уровнем экспрессии ЕРО в трофобласте плацент РК может указывать на дисбаланс между про- и антиапоптотическими механизмами.

Несмотря на выраженные морфологические изменения в плацентах РК, перинатальные исходы у этих пациенток благоприятны. Можно предположить, что это связано с компенсирующим влиянием лечебных и профилактических мероприятий [12, 18]. Последние включают продленное применение НМГ в профилактических дозах, витаминов С, Е, D.

Заключение

Острая COVID-19 во II и III триместрах гестации приводит к выраженным плацентарным повреждениям в форме материнской и фетальной мальперфузии, хронических воспалительных изменений, которые регистрируются у реконвалесцентов на доношенном сроке беременности. При манифестации COVID-19 в I триместре эти изменения незначительны. В то же время гипоксическое повреждение, активность апоптоза в плацентах выражены независимо от триместра манифестации COVID-19. Высокий уровень выраженности реакции одновременно и на маркеры гипоксии

(Hif-1 α , EPO), и на маркер апоптоза (Caspase-3) свидетельствует о дисбалансе между проапоптотическими и антиапоптотическими механизмами на фоне хронической плацентарной недостаточности смешанного генеза.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Е. Воропаева, Э.А. Казачкова, Л.С. Ищенко, Е.Л. Казачков.

Сбор и обработка материала – Е.Е. Воропаева, Л.С. Ищенко.

Анализ данных – Л.С. Ищенко, А.Ю. Холопова, Т.Н. Шамаева.

Написание текста – Л.С. Ищенко.

Редактирование – Э.А. Казачкова, Е.Л. Казачков.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.Е. Voropaeva, E.A. Kazachkova, L.S. Ishchenko, E.L. Kazachkov.

Data collection – Е.Е. Voropaeva, L.S. Ishchenko.

Data analysis – L.S. Ishchenko, A.Yu. Kholopova, T.N. Shamaeva.

Wrote the paper – L.S. Ishchenko.

Edited the manuscript – E.A. Kazachkova, E.L. Kazachkov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(1):36–43. DOI: 10.1016/j.mib.2011.11.006.
2. Sallout B, Walker M. The fetal origin of adult diseases. *J Obstet Gynaecol.* 2003;23(5):555–60. DOI: 10.1080/0144361031000156483.
3. Щеголев А.И., Туманова У.Н., Серов В.Н. Поражения плаценты у беременных с SARS-CoV-2-инфекцией. *Акушерство и гинекология.* 2020;12:44–52. DOI: 10.18565/aig.2020.12.44-52.
Shchegolev AI, Tumanova UN, Serov VN. Placental lesions in pregnant women with SARS-COV-2 infection. *Akusherstvo i Ginekologiya = Obstetrics and Gynecology.* 2020;12:44–52 (In Russ.). DOI: 10.18565/aig.2020.12.44-52.
4. Воропаева Е.Е., Хайдукова Ю.В., Казачкова Э.А., Казачков Е.Л., Шамаева Т.Н., Алиева А.А. и др. Перинатальные исходы и результаты морфологического исследования плаценты у беременных с критическим поражением легких при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Уральский медицинский журнал.* 2023;22(2):109–121. DOI: 10.52420/2071-5943-2023-22-2-109-121.
Voropaeva EE, Khaidukova YuV, Kazachkova EA, Kazachkov EL, Shamaeva TN, Aliyeva AA et al. Perinatal outcomes and morphological examination of placentas in pregnant women with critical lung lesions in new COVID-19 coronavirus infection. *Ural Medical Journal.* 2023;22(2):109–121 (In Russ.). DOI: 10.52420/2071-5943-2023-22-2-109-121.
5. Theiler RN, Warring SK, Young MC, Santos J, Branda ME, Quinton RA et al. Association of SARS-CoV-2 Infection during pregnancy with placental weight and histopathologic lesions. *Placenta.* 2025;159:180–6. DOI: 10.1016/j.placenta.2024.12.017.
6. Ищенко Л.С., Воропаева Е.Е., Казачков Е.Л., Казачкова Э.А., Холопова А.Ю., Хайдукова Ю.В. и др. Особенности плацентарных повреждений у пациенток с перинатальными потерями при преждевременных родах и острым COVID-19. *Якутский медицинский журнал.* 2024;4:76–79. DOI: 10.25789/YMJ.2024.88.18.
Ishchenko LS, Voropaeva EE, Kazachkov EL, Kazachkova EA, Kholopova AYU, Khaidukova YuV et al. Features of placental damage in patients with perinatal losses during premature birth and acute COVID-19. *Yakut Medical Journal.* 2024;4:76–79 (In Russ.). DOI: 10.25789/YMJ.2024.88.18.
7. Schwartz DA, Avvad-Portari E, Babál P, Baldewijns M, Blomberg M, Bouachba A et al. Placental tissue destruction and insufficiency from COVID-19 causes stillbirth and neonatal death from hypoxic-ischemic injury. *Arch Pathol Lab Med.* 2022;146(6):660–76. DOI: 10.5858/arpa.2022-0029-SA.
8. Боровая С.Ю., Якимова А.В., Агеева Т.А., Мудров В.А. Оценка влияния COVID-19, перенесенной в различные сроки гестации, на перинатальные исходы и структурные изменения плаценты. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2024;73(1):17–28. DOI: 10.17816/JOWD624435.
Borovaya SYU, Yakimova AV, Ageeva TA, Mudrov VA. Assessment of the impact of COVID-19 experienced at different stages of gestation on perinatal outcomes and structural changes in the placenta. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2024;73(1):17–28 (In Russ.). DOI: 10.17816/JOWD624435.
9. Гутикова Л.В., Ганчар Е.П., Зверко В.Л., Лучко Е.В., Луначик Е.И., Пашенко Е.Н. Патогистология плаценты, плацентарного ложа у женщин, перенесших COVID-19 во время беременности. *Охрана материнства и детства.* 2023;2(42):55–65. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=62585478> (получено 05.06.2025).
Gutikova LV, Ganchar EP, Zverko VL, Luchko EV, Lupachik EI, Pashenko EN. Pathohistology of the placenta, placental bed in women who had COVID-19 during pregnancy. *Maternity and child welfare.* 2023;2(42):55–65 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=62585478> (accessed 05.06.2025).
10. Wong YP, Tan GC, Omar SZ, Mustangin M, Singh Y, Salker MS et al. SARS-CoV-2 infection in pregnancy: placental histomorphological patterns, disease severity and perinatal outcomes. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(15):9517. DOI: 10.3390/ijerph19159517.
11. Boyraz B, James K, Hornick JL, Roberts DJ. Placental pathology from COVID-19–recovered (nonacute) patients. *Hum Pathol.* 2022;125:18–22. DOI: 10.1016/j.humpath.2022.04.005.
12. Dagelic A, Stefanovic V, Resic Karara J, Kuzmic Prusac I, Roje D, Kosovic I et al. Does COVID-19 infection acquired in different pregnancy trimester influence placental pathology? *J Perinat Med.* 2023;51(5):607–13. DOI: 10.1515/jpm-2022-0452.
13. DC Allen, RI Cameron (eds.). *Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects.* 3rd ed. Springer Cham, 2017. 564 p. DOI: 10.1007/978-3-319-57360-1.
14. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NC, Boyd TK, Brundler MA et al. Sampling and definitions of placental lesions: Amsterdam Placental Workshop Group consensus statement. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(7):698–713. DOI: 10.5858/arpa.2015-0225-CC.

15. Щеголев А.И. Современная морфологическая классификация повреждений плаценты. *Акушерство и гинекология*. 2016;4:16–23. DOI: 10.18565/aig.2016.4.16-23.
Shchegolev AI. Current morphological classification of damages to the placenta. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2016;4:16–23 (In Russ.). DOI: 10.18565/aig.2016.4.16-23.
16. Pell R, Oien K, Robinson M, Pitman H, Rajpoot N, Rittscher J *et al*. The use of digital pathology and image analysis in clinical trials. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(2):81–90. DOI: 10.1002/cjp.2127.
17. Cecchinia R, Cecchini AL. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Med Hypotheses*. 2020;143:110102. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110102.
18. de Las Heras N, Martín Giménez VM, Ferder L, Manucha W, Lahera V. Implications of oxidative stress and potential role of mitochondrial dysfunction in COVID-19: therapeutic effects of vitamin D. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):897. DOI: 10.3390/antiox9090897.
19. Rolfo A, Cosma S, Nuzzo AM, Salio C, Moretti L, Sassoè-Pognetto M *et al*. Increased placental anti-oxidant response in asymptomatic and symptomatic COVID-19 third-trimester pregnancies. *Biomedicines*. 2022;10(3):634. DOI: 10.3390/biomedicines10030634.
20. Воропаева Е.Е., Хайдукова Ю.В., Холопова А.Ю., Алиева А.А., Казачкова Э.А., Казачков Е.Л. Процессы апоптоза и гипоксии в плацентах у беременных женщин при COVID-19 и критическом поражении легких. Непрерывное медицинское образование и наука. 2024;19(1):28–33. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=67354133> (получено 05.06.2025).
Voropaeva EE, Hajdukova YuV, Holopova AY, Alieva AA, Kazachkova EA, Kazachkov EL. Apoptosis and hypoxia processes in placentas of pregnant women with COVID-19 and critical lung injury. *Nepreryynnoe meditsinskoe obrazovanie i nauka = Continuing medical education and science*. 2024;19(1):28–33 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=67354133> (accessed 05.06.2025).
21. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(7):1376–93. DOI: 10.1007/s00018-003-2370-y.
22. Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman TR, Cerami A, Brines M *et al*. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced *in vivo* by severe chronic hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(46):17531–6. DOI: 10.1073/pnas.0608814103.
23. Fairchild Benyo D, Conrad KP. Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol Reprod*. 1999;60(4):861–70. DOI: 10.1095/biolreprod60.4.861.
24. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist*. 2004;9(Suppl. 5): 18–30. DOI: 10.1634/theoncologist.9-90005-18.
25. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Reports*. 2003;2(6):465–70. PMID: 14561390.
26. Wardhana MP, Kuntaman K, Utomo B, Aryananda RA, Rifdah SN, Wafa IA *et al*. Evidence of placental villous inflammation and apoptosis in third-trimester symptomatic SARS-CoV-2 maternal infection. *Yonsei Med J*. 2024;65(4):202–9. DOI: 10.3349/ymj.2023.0309.
27. Bachnas MA, Putri AO, Rahmi E, Pranabakti RA, Anggraini NWP, Astetri L *et al*. Placental damage comparison between preeclampsia with COVID-19, COVID-19, and preeclampsia: analysis of caspase-3, caspase-1, and TNF-alpha expression. *AJOG Glob Rep*. 2023;3(3):100234. DOI: 10.1016/j.xagr.2023.100234.
28. Сухих Г.Т., Красный А.М., Кан Н.Е., Майорова Т.Д., Тютюник В.Л., Ховхаева П.А. и др. Апоптоз и экспрессия ферментов антиоксидантной защиты в плаценте при преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2015;3:11–15. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23272305> (получено 05.06.2025).
Sukhikh GT, Krasnyi AM, Kan NE, Maiorova TD, Tyutyunik VL, Khovkhaeva PA et al. Placental apoptosis and antioxidant defense enzyme gene expression in preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2015;3:11–15 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23272305> (accessed 05.06.2025).

Информация об авторах

Екатерина Евгеньевна Воропаева – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Элла Алексеевна Казачкова – доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии ЮУГМУ.

Людмила Станиславовна Ищенко – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии ЮУГМУ.

Евгений Леонидович Казачков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Анна Юрьевна Холопова – аспирантка кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Татьяна Николаевна Шамаева – кандидат педагогических наук, доцент кафедры математики, медицинской информатики, информатики и статистики, физики ЮУГМУ.

Author information

Ekaterina E. Voropaeva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-0800-3380>

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>

Lyudmila S. Ishchenko – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-9405-0134>

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.
<https://orcid.org/0000-0002-2008-7671>

Anna Yu. Kholopova – Postgraduate Student, V.L. Kovalenko Department of Anatomic Pathology and Forensic Medicine, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-5559-0069>

Tatyana N. Shamaeva – Cand. Sci. (Ped.), Associate Professor, Department of Mathematics, Medical Informatics, Informatics and Statistics, Physics, South Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-6327-2685>

Морфофункциональные особенности миокарда глубоконеодоношенных новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию

М.В. Малышева, Л.В. Кулида, Е.В. Проценко

ФГБУ Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова Минздрава России, Иваново, Россия

Резюме. Введение. Ведущее место в структуре причин перинатальной заболеваемости и смертности у глубоконеодоношенных новорожденных занимают гипоксические поражения сердечно-сосудистой системы. При гипоксии снижается сократительная функция миокарда, от степени выраженности которой зависит исход развития данной патологии. В связи с этим особо актуальными становятся определение маркеров и углубленное изучение морфологических и функциональных особенностей миокарда глубоконеодоношенных детей, перенесших внутриутробную гипоксию, поэтому целью настоящего исследования было выявление морфофункциональных особенностей миокарда новорожденных с экстремально низкой и очень низкой массой тела.

Материалы и методы. Проведено комплексное морфологическое исследование, включающее трансмиссионную электронную микроскопию и иммуногистохимию образцов миокарда новорожденных с экстремально низкой массой тела и очень низкой массой тела, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию.

Результаты. У новорожденных на 22–27-й неделе гестации, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, выявлены признаки гестационной незрелости миокарда, деструктивные изменения ультраструктур саркоплазмы кардиомиоцитов правого желудочка, индекс выраженности реакции на сTnT составил 1,43 условной единицы (у.е.) (1,28; 1,62), миоглобина – 0,5 у.е. (0,4; 0,55), TGF β 1 – 0,35 у.е. (0,18; 0,54). У новорожденных на 28–32-й неделе гестации гипоксическое повреждение кардиомиоцитов сопровождается компенсаторной гипертрофией правого желудочка сердца, деструктивными изменениями ядер и субтотальной вакуолизацией ультраструктур саркоплазмы, уменьшением ($p=0,001$) значений индексов выраженности реакции на сTnT до 0,9 у.е. (0,79; 1,05) и миоглобин до 0,42 у.е. (0,38; 0,45), а также увеличением ($p=0,001$) индекса выраженности реакции на TGF β 1 до 0,55 у.е. (0,4; 0,7). **Заключение.** Основными морфофункциональными особенностями миокарда новорожденных на 22–27-й неделе гестации, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, являются незрелость и явные деструктивные изменения ультраструктур кардиомиоцитов в сочетании с низкой выраженностью реакции на сTnT и миоглобин. У новорожденных на 28–32-й неделе гестации гипоксическое повреждение миокарда отличается гипертрофией правого желудочка сердца, деструктивными изменениями ядер кардиомиоцитов и субтотальной вакуолизацией ультраструктур саркоплазмы.

Ключевые слова: внутриутробная гипоксия, глубоконеодоношенные дети, кардиомиоциты, сердечный тропонин Т, миоглобин, трансформирующий фактор роста β 1

Для корреспонденции: Елена Васильевна Проценко. E-mail: procenko_e_v@mail.ru

Для цитирования: Малышева М.В., Кулида Л.В., Проценко Е.В. Морфофункциональные особенности миокарда глубоконеодоношенных новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):60–68. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.60-68.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 25.02.2025. Получена после рецензирования 21.04.2025. Принята в печать 26.06.2025.

Morphological and functional features of the myocardium of extremely premature newborns with chronic intrauterine hypoxia

M.V. Malysheva, L.V. Kulida, E.V. Procenko

V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia

Abstract. Introduction. Hypoxic injury to the cardiovascular system is a leading cause of perinatal morbidity and mortality in extremely premature infants. Myocardial hypoxia leads to impaired contractile function,

the severity of which largely determines disease progression and outcome. Therefore, identifying markers and conducting an in-depth analysis of the morphological and functional features of the myocardium in extremely premature infants with intrauterine hypoxia are of particular relevance. The present study aimed to identify the morphological and functional features of the myocardium in newborns with extremely low and very low birth weight.

Materials and methods. A comprehensive morphological study was performed using transmission electron microscopy and immunohistochemistry on myocardial samples from newborns with extremely low ($n=25$) and very low birth weight ($n=15$) with chronic intrauterine hypoxia.

Results. In newborns aged 22–27 weeks with chronic intrauterine hypoxia, we observed signs of myocardial immaturity and destructive changes in the ultrastructure of right ventricular cardiomyocyte sarcoplasm. The expression indices were the following: cTnT—1.43 (1.28; 1.62) c.u., myoglobin—0.5 (0.4; 0.55) c.u., and TGF β_1 —0.35 (0.18; 0.54) c.u. In newborns aged 28–32 weeks, hypoxic damage to cardiomyocytes was accompanied by compensatory right ventricular hypertrophy, nuclear damage, and subtotal vacuolization of sarcoplasmic ultrastructure. These changes were associated with a decrease in cTnT to 0.9 (0.79; 1.05) c.u. ($p=0.001$) and myoglobin to 0.42 (0.38; 0.45) c.u. ($p=0.001$), as well as an increase in TGF β_1 expression to 0.55 (0.4; 0.7) c.u. ($p=0.001$).

Conclusion. In extremely premature infants (22–27 weeks), chronic intrauterine hypoxia is distinguished by myocardial immaturity and pronounced ultrastructural damage accompanied by low expression of cTnT and myoglobin. In newborns aged 28–32 weeks, hypoxic myocardial injury is characterized by right ventricular hypertrophy, destructive nuclear changes, and subtotal vacuolization of the ultrastructure of the sarcoplasm.

Keywords: intrauterine hypoxia, extremely premature infants, cardiomyocytes, cardiac troponin T, myoglobin, transforming growth factor β_1

Corresponding author: Elena V. Procenko. E-mail: procenko_e_v@mail.ru

For citation: Malysheva M.V., Kulida L.V., Procenko E.V. Morphological and functional features of the myocardium of extremely premature newborns with chronic intrauterine hypoxia. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):60–68 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.60-68.

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

Received 25.02.2025. **Received in revised form** 21.04.2025. **Accepted** 26.06.2025.

Введение

Гипоксические повреждения миокарда являются одной из первостепенных причин перинатальной заболеваемости и встречаются у 40–70% глубоко недоношенных новорожденных [1]. У детей, родившихся с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ), эти повреждения фиксируются чаще (58%), чем у детей с очень низкой массой тела (ОНМТ) при рождении (46,1%) [2]. Исследования показывают, что гипоксия вызывает целый ряд метаболических и микроциркуляторных изменений миокарда, что в свою очередь приводит к сбоям в сердечном ритме и снижению сократительной функции [3–5]. Основными звеньями морфогенеза хронической гипоксии плода выступают прогрессирующая хроническая плацентарная недостаточность и нарушения кровотока в системе мать–плацента–плод [6–8]. Патоморфологические изменения в миокарде, как правило, представлены нарушением ориентации миофибрилл и исчезновением поперечной исчерченности на фоне венозного застоя и мелкоочаговых периваскулярных кровоизлияний [9].

Сегодня в кардиологии детского возраста широко используются диагностические возможности биохимических маркеров гипоксических повреждений миокарда. Повышение в крови концентрации кардиоспецифических ферментов (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы-1,

креатинфосфокиназы, креатинкиназы-МВ, тропонин I), кардиотропонина Т (сTnT) и миоглобина свидетельствует о деструкции плазмолеммы кардиомиоцитов, что сопровождается высвобождением элементов саркоплазмы, образованием зональных микронекрозов, снижением сократительной функции миокарда [10, 11]. Классическим индикатором необратимых повреждений кардиомиоцитов считается сочетанное снижение тропонина с миоглобином, способствующее уменьшению энергетического потенциала сократительной способности сердца [12, 13]. Перечисленные выше тропонины, будучи структурными элементами сократительного аппарата гладкомышечных клеток, высвобождаются в кровь вследствие ферментативного разрушения кардиомиоцитов [14–16].

В современных исследованиях показана значительная роль трансформирующего фактора роста (TGF β_1) в развитии патологии сердечно-сосудистой системы на разных этапах онтогенеза человека. Изоформа TGF β_1 , наиболее важная для этой системы, обнаруживается в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, миофибробластах и макрофагах. При гипоксических повреждениях миокарда TGF β_1 стимулирует синтез коллагена и участвует в формировании фиброзных изменений сердца [19, 20].

В настоящее время как в отечественных, так и в зарубежных исследованиях особенности гестационного

ремоделирования миокарда и влияние таковых на формирование патологии сердечно-сосудистой системы у глубоконедоношенных детей освещены недостаточно.

Цель данного исследования – выявить морфофункциональные особенности миокарда новорожденных с ЭНМТ и ОНМТ, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию.

Материалы и методы

Исследование, проведенное на базе лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии Ивановского научно-исследовательского института материнства и детства имени В.Н. Городкова, одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 4 от 19.10.2015).

Изучали миокард умерших глубоконедоношенных живорожденных детей, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию: 25 образцов от новорожденных с ЭНМТ гестационного возраста 22–27 недель 6 дней (1-я группа) и 15 образцов от детей с ОНМТ, родившихся в сроки гестации 28–32 недели 6 дней (2-я группа). Причины смерти детей обеих групп были схожими: нетравматические внутрижелудочковые кровоизлияния III степени (1-я группа – 48,0%, n=12; 2-я группа – 53,3%, n=8), тяжелая врожденная пневмония (1-я группа – 32,0%, n=8; 2-я группа – 26,7%, n=3), неонатальный сепсис (1-я группа – 8,0%, n=2; 2-я группа – 20,0%, n=4). У новорожденных 1-й группы в 12,0% случаев (n=3) смерть наступила в результате респираторного дистресс-синдрома.

Для исследования материала применяли морфологические методы, включающие макровизуализацию объекта, органомерию с использованием морфометрических параметров, предложенных Т.Г. Траль и В.Б. Мацкевичем (2010) в качестве эталонных для сердца разных сроков гестации [21], раздельное взвешивание сердца по методу В.Б. Мацкевича (2005) [22], обзорное гистологическое исследование, гистометрию паренхиматозных и интерстициальных элементов миокарда, цитокариометрию, трансмиссионную электронную микроскопию с помощью электронного микроскопа ЭВМ-100 АК (г. Сумы).

Изготовление парафиновых срезов с окрашиванием гематоксилином и эозином проводилось по стандартной методике. Для гисто-, цитокариометрии и определения плотности расположения ядер кардиомиоцитов применялась программа для персонального компьютера «ВидеоТест-Морфология» 4,0 («ВидеоТест», Россия). Иммуногистохимические реакции с кроличьими поликлональными антителами к TGFβ1 и cTnT (Biorbyt, Великобритания) ставили при разведении 1:800. С антителами к миоглобину (Biorbyt, Великобритания) использовали разведение 1:50. В качестве системы детекции использовали UltraVision Quanto Detection System HRP (ThermoFisher Scientific, США). Результат оценивали в 100 клетках десяти разных полей зрения микроскопа при ×400 по системе гистологиче-

ского счета H-score путем вычисления индекса выраженности реакции (ИБР) биомаркера по формуле: $ИБР = \Sigma P(i) \times i/100$, где i – интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (отрицательная, минимальная, умеренная и максимальная), $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Цифровой материал обрабатывали статистическими методами при помощи стандартного пакета программного обеспечения Excel 2010 (Microsoft, США) и STATISTICA 6 (StatSoft, США). Предварительно определяли тип распределения вариационного ряда и вычисляли медиану с указанием 25-го и 75-го перцентилей (Me [Q25; Q75]). Для попарного сравнения различий между вариационными рядами исследуемых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. $p < 0,05$ расценивался как статистически значимый.

Результаты

В работе задействовались образцы миокарда глубоконедоношенных новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, ассоциированную с материнской патологией и дисфункцией плаценты.

Как правило, матери новорожденных исследуемых групп имели акушерско-гинекологический анамнез, отягощенный медицинским абортom (82,5%), привычным невынашиванием беременности (42,5%), эндометриозом (17,5%), истмико-цервикальной недостаточностью (15%) и соматическими заболеваниями – артериальной гипертензией (22,5%), ожирением (12,5%), аутоиммунным тиреоидитом (7,5%), без достоверных межгрупповых различий по частоте встречаемости таковых. Тем не менее инфекционно-воспалительные заболевания, такие как хронический эндометрит, пиелонефрит, тонзиллит, наиболее часто ($p=0,02$) диагностировались у матерей 2-й группы – 73,3% (n=11) по сравнению с 1-й – 40% (n=6).

У женщин обеих групп выявлены такие осложнения беременности как хроническая плацентарная недостаточность (92,5%), гестационный сахарный диабет (30%), преэклампсия (45%), преждевременный разрыв плодных оболочек (47,5%), задержка внутриутробного развития плода (32,5%).

Хроническая плацентарная недостаточность в 1-й группе была обусловлена базальным и париетальным децидуитом в сочетании с хроническим villuzитом и нарушениями дифференцировки сосудисто-стромального компонента ворсин (60%, n=15). В плацентах 2-й группы чаще встречались хронические нарушения маточно-плацентарного кровообращения в сочетании с поствоспалительной облитерационной ангиопатией и фиброзом стромы ворсин (53,3%, n=8).

Новорожденные 1-й группы чаще имели гестационный возраст 22–24 недели – 80% (n=20), 2-й группы – 28–30 недель – 40% (n=6). Дети с ЭНМТ чаще, чем новорожденные с ОНМТ ($p=0,0152$), рождались в тяжелой асфиксии с оценкой по шкале Апгар на пер-

вой минуте от 1 до 3 баллов, сохраняющейся на пятой минуте (52%, n=13). Во 2-й группе в состоянии тяжелой асфиксии родились пять детей (33,3%), а сохранение таковой на пятой минуте жизни констатировано у двух новорожденных (13,3%).

У новорожденных 1-й группы в 33,7% случаев (n=8) выявлена задержка внутриутробного развития. Во 2-й группе, соответственно, она наблюдалась в 41,6% случаев (n=6).

По результатам органометрии масса сердца у новорожденных с ОНМТ – 8,7 г (8,0; 9,3) – превышает (p=0,006) аналогичный показатель детей с ЭНМТ –

6,0 г (4,0; 12,0). Прибавка в весе обусловлена не только гестационными изменениями (+33,3%), но еще и гипертрофией правого желудочка (+11,7%), что установлено при раздельном взвешивании сердца (табл. 1).

Гисто- и цитокариометрия образцов миокарда данной локализации у глубоко недоношенных новорожденных гестационного возраста 28–32 недели 6 дней позволила выявить увеличение площади ядер кардиомиоцитов, удельной площади мышечного компонента и снижение площади интерстициальной ткани по сравнению с аналогичными параметрами детей гестационного возраста 22–27 недель 6 дней (табл. 2).

Таблица 1 | Table 1

Параметры раздельного взвешивания сердца новорожденных на 22–27-й и 28–32-й неделях гестации, Ме (Q25; Q75) | Parameters of separate cardiac chamber weights in newborns at 22–27 and 28–32 weeks of gestation, Me (Q25; Q75)

Параметры, мг Parameters, mg	22–27 недель 22–27 weeks n=25	28–32 недели 28–32 weeks n=15	Достоверность различий, p Statistical significance, p
Левое предсердие Left atrium	298,0 (232,75; 385,75)	531,0 (417,0; 555,5)	0,0284
Левый желудочек Left ventricle	1042 (958,0; 1413,75)	1873,0 (1620,5; 1915,5)	0,0497
Правое предсердие Right atrium	310,0 (222,0; 450,25)	594,0 (584,0; 607,5)	0,0001
Правый желудочек Right ventricle	1309 (1028,25; 1514,5)	2060,0 (1995,0; 2736,5)	0,0254
Межпредсердная перегородка Interatrial septum	160 (125; 237,5)	280,0 (255,0; 401,0)	0,0001
Межжелудочковая перегородка Interventricular septum	1032,5 (954,5; 1380)	1660,0 (1520,0; 1937,0)	0,0058

Статистически значимая достоверность результатов при p<0,05 (U-критерий Манна–Уитни) | Statically significant results at p<0.05 (Mann–Whitney U test)

Таблица 2 | Table 2

Морфометрические параметры правого желудочка сердца новорожденных с ЭНМТ и ОНМТ, Ме (Q25; Q75) | Morphometric parameters of the right ventricle in newborns with extremely low birth weight and very low birth weight, Me (Q25; Q75)

Морфометрические параметры Morphometric parameters	22–27 недель 22–27 weeks n=25	28–32 недели 28–32 weeks n=15	Достоверность различий, p Statistical significance, p
Площадь ядер кардиомиоцитов, мкм² Area of cardiomyocyte nuclei, µm²	20,72 (19,4; 22,57)	26,84 (22,08; 24,51)	0,001
Плотность расположения ядер кардиомиоцитов, ед/мм² Density of cardiomyocyte nuclei, units/mm²	591 (552; 602)	510 (497; 521)	0,04
Удельная площадь мышечного компонента миокарда, % Specific area of the muscular component of the myocardium, %	78,83 (76,78; 79,24)	85,24 (83,42; 86,92)	0,004
Удельная площадь интерстициального компонента миокарда, % Specific area of the interstitial component of the myocardium, %	21,17 (20,06; 22,23)	14,76 (13,08; 16,58)	0,001

Статистически значимая достоверность результатов при p<0,05 (U-критерий Манна–Уитни) | Statically significant results at p<0.05 (Mann–Whitney U test)

Микроскопически у всех глубоконедоношенных новорожденных выявлены изменения, обусловленные хронической внутриутробной гипоксией: волнообразное деформирование миофибрилл с фокальным некрозом кардиомиоцитов и гемодинамические нарушения на уровне микроциркуляции в виде полнокровия венул, сладжирования эритроцитов в просвете капилляров, мелкоочаговых паравазатов, интерстициального отека (рис. 1, 2). Отек и некроз преимущественно наблюда-

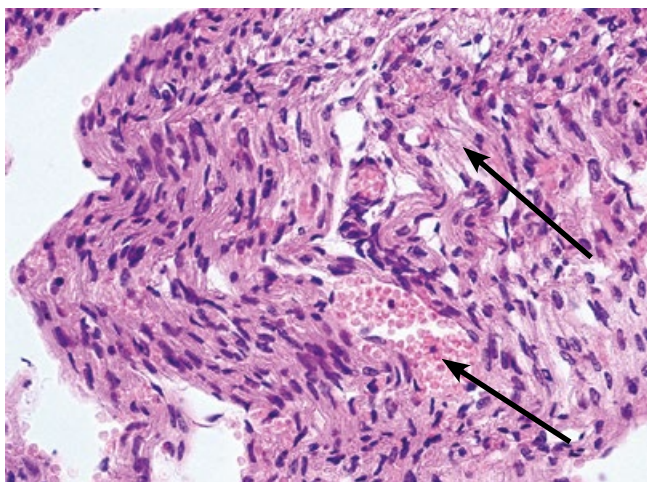


Рис. 1. Волнообразное деформирование миофибрилл (стрелка) и полнокровие венул (стрелка) у новорожденного на 24-й неделе гестации, перенесшего хроническую внутриутробную гипоксию. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 1. Wave-like deformation of myofibrils (arrow) and venule congestion (arrow) in a 24-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia. H&E stain, ×400

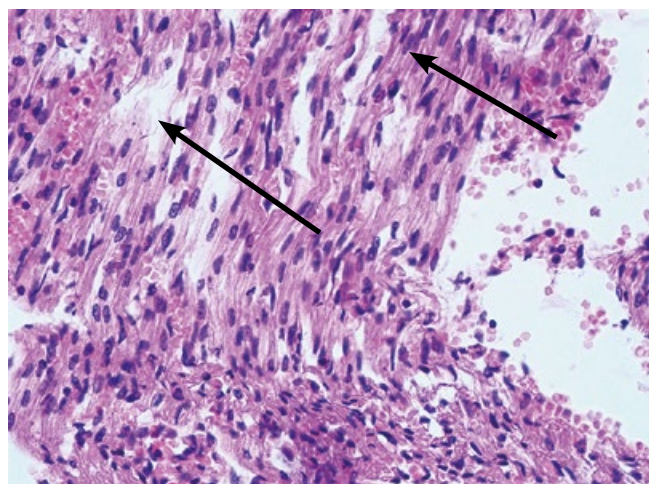


Рис. 2. Зона интерстициального отека и некроза (стрелка), периваскулярное кровоизлияние (стрелка) у новорожденного на 28-й неделе гестации, перенесшего хроническую внутриутробную гипоксию. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 2. Area of interstitial edema and necrosis (arrow), perivascular hemorrhage (arrow) in a 28-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia. H&E stain, ×400

лись в правом желудочке, в частности в папиллярных мышцах и субэндокардиальном слое. У новорожденных с ЭНМТ микроциркуляторные изменения были более распространенными и сопровождались очаговыми нарушениями упорядоченного расположения кардиомиоцитов и эозинофилией.

Для оценки сократительной функции кардиомиоцитов глубоконедоношенных новорожденных было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к сTnT и миоглобину.

У детей гестационного возраста 22–27 недель 6 дней наблюдалась слабовыраженная реакция на сTnT в правом желудочке, а в зонах некроза и деструкции мышечных волокон таковая не определялась. ИВР маркера составил 0,9 условной единицы (у.е.) (0,79; 1,05), что ниже ($p=0,004$) аналогичного параметра детей гестационного возраста 28–32 недели 6 дней – 1,43 у.е. (1,28; 1,62) (рис. 3).

Иммуногистохимическая реакция на миоглобин определялась в виде гранулярных включений в саркоплазме кардиомиоцитов темно-коричневого цвета. У новорожденных с ЭНМТ ИВР был невысоким и составил всего 0,51 у.е. (0,41; 0,56) (рис. 4), тогда как у новорожденных с ОНМТ он оказался еще ниже ($p=0,001$) – 0,42 у.е. (0,38; 0,45).

Для оценки соединительнотканного компонента желудочков сердца проводилось иммуногистохимическое исследование с антителами к TGF $\beta 1$. Слабовыраженная иммуногистохимическая реакция визуализирована в интерстициальном компоненте миокарда правого желудочка, фибробластах и эндотелии сосудов микроциркуляторного русла у новорожденных с ЭНМТ. При этом ИВР маркера составил 0,34 у.е. (0,18; 0,54). У детей,

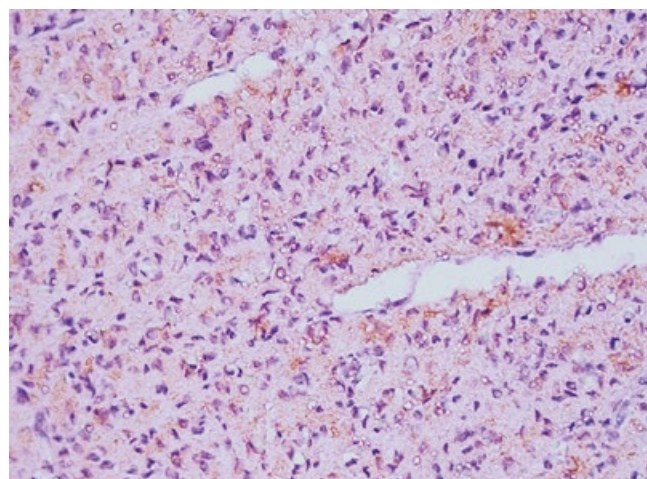


Рис. 3. Слабая реакция на сTnT в миокарде правого желудочка у новорожденного на 25-й неделе гестации при хронической внутриутробной гипоксии. Иммуногистохимическая реакция, ×400

Fig. 3. Weak cTnT expression in the myocardium of the right ventricle in a 25-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia. Immunohistochemical reaction, ×400

родившихся с ОНМТ, констатируется незначительное увеличение реакции на TGF $\beta 1$ ($p=0,001$): ИВР составил 0,55 у.е. (0,4; 0,7).

При трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) образцов сердца глубоконедоношенных детей,

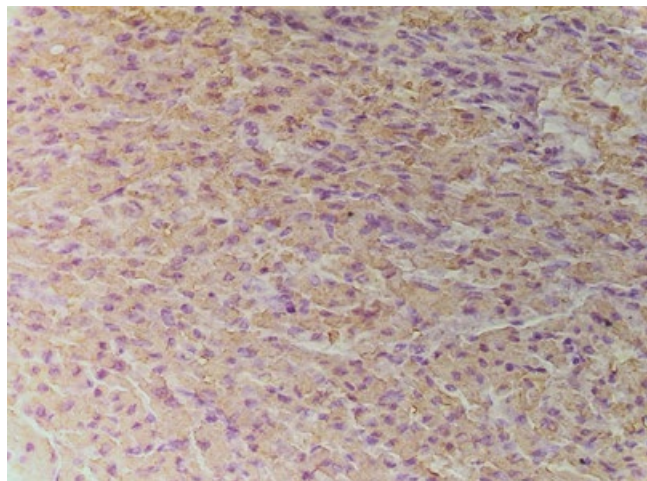


Рис. 4. Слабая реакция на миоглобин в миокарде правого желудочка у новорожденного на 29-й неделе гестации при хронической внутриутробной гипоксии. Иммуногистохимическая реакция, $\times 400$

Fig. 4. Weak myoglobin expression in the myocardium of the right ventricle in a 29-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia. Immunohistochemical reaction, $\times 400$

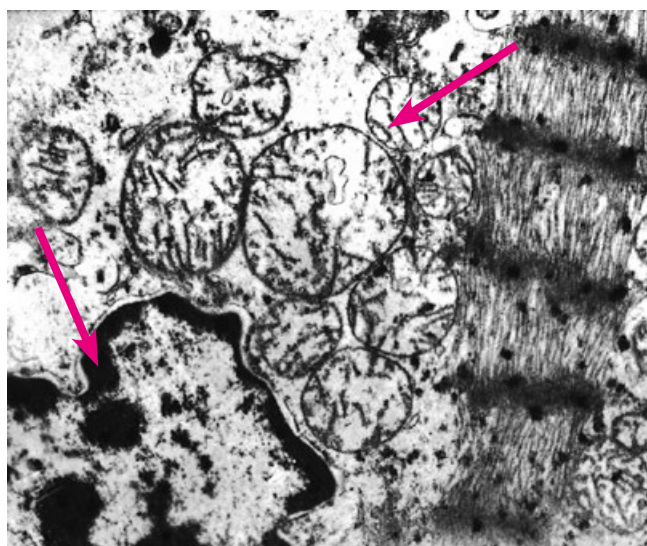


Рис. 5. Кардиомиоцит правого желудочка новорожденного на 27-й неделе гестации при хронической внутриутробной гипоксии: маргинация ядерного хроматина (стрелка) и разрушение крист митохондрий, контактирующих с миофибриллами (стрелка). ТЭМ

Fig. 5. Cardiomyocyte of the right ventricle in a 27-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia: margination of nuclear chromatin (arrow) and destruction of mitochondrial cristae in contact with myofibrils (arrow). TEM

как правило, определялись следующие особенности: субмембранная локализация ядерного гетерохроматина с его фрагментарными скоплениями в центральных отделах ядра и инвагинаты нуклеолеммы в саркоплазму. В перинуклеарной зоне саркоплазмы кардиомиоцитов у детей с ЭНМТ визуализировались плотно контактирующие между собой поврежденные ультраструктуры – истонченные миофибриллы на фоне отека саркоплазмы и вакуолизированные митохондрии с полуразрушенными кристами (рис. 5), свидетельствующие о дефиците энергетического потенциала. У новорожденных с ОНМТ наблюдались такие изменения как сочетание класматоза ядра кардиомиоцитов с набуханием и фрагментацией миофибрилл, отсутствие плотных контактов последних с митохондриями, нечеткие контуры Z-дисков (рис. 6), свидетельствующие о нарушении сократительной способности миокарда.

Обсуждение

Изучение миокарда глубоконедоношенных детей с применением комплексного морфологического исследования позволило выявить ряд структурных межгрупповых различий.

По результатам органомерии масса сердца у детей 2-й группы оказалась почти в 1,5 раза больше аналога 1-й группы, что не только объясняется гестационным увеличением массы органа, но также может быть связано с гипертрофией правого желудочка, обусловленной нарушением соотношения между интерстициальным

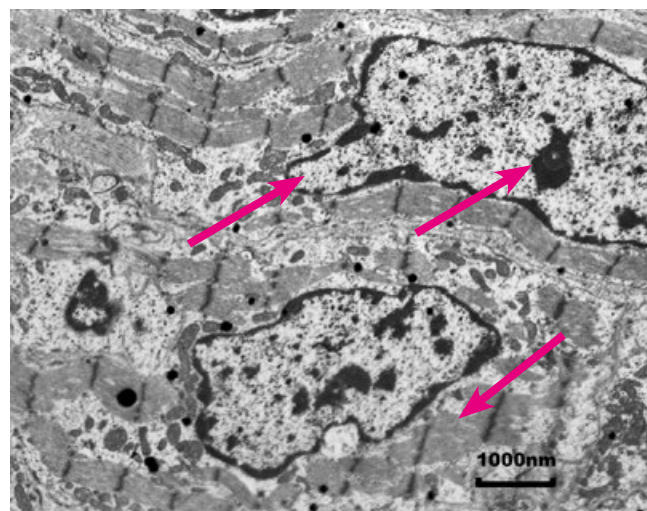


Рис. 6. Кардиомиоцит правого желудочка новорожденного на 30-й неделе гестации при хронической внутриутробной гипоксии: класматоз ядра (стрелка), центральное расположение гетерохроматина (стрелка), разбухание миофибрилл (стрелка). ТЭМ

Fig. 6. Cardiomyocyte of the right ventricle in a 30-week-old newborn with chronic intrauterine hypoxia: nuclear clasmatosis (arrow), central location of heterochromatin (arrow), swelling of myofibrils (arrow). TEM

и мышечным компонентами миокарда в пользу последнего и компенсаторной гипертрофией ядер кардиомиоцитов [18].

Морфологическая картина гипоксического поражения миокарда глубоконедоношенных детей в наибольшей степени была выражена в правом желудочке. Кроме однотипных изменений (нарушение микрогемодинамики, локальные некрозы), обнаружены гестационные различия в виде очаговых нарушений архитектоники миокарда у новорожденных с ЭНМТ и отсутствие таковых у детей с ОНМТ. Подобное структурное различие, вероятно, определяется длительностью и степенью тяжести внутриутробной гипоксии, а также реактивностью миокарда [19] на фоне незавершенной гестационной дифференцировки кардиомиоцитов, подтвержденной результатами трансмиссионной электронной микроскопии.

Иммуногистохимическая оценка сократительной способности кардиомиоцитов позволила констатировать слабовыраженную реакцию на сTnT и миоглобин у новорожденных обеих групп, что связано с гестационной незрелостью миокарда на фоне гипоксического повреждения. Реакция на TGF β 1 в миокарде глубоконедоношенных детей, перенесших внутриутробную гипоксию (невысокая, несмотря на положительную гестационную динамику), обеспечила низкую сократительную способность сердца и возможность развития фиброза миокарда на последующих этапах онтогенеза [20].

Заключение

Основными морфофункциональными особенностями миокарда новорожденных с экстремально низкой массой тела, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, являются гестационная незрелость и выраженные деструктивные изменения ультраструктур кардиомиоцитов в сочетании со слабой выраженностью реакции на сTnT, миоглобин и TGF β 1.

У новорожденных с очень низкой массой тела длительное гипоксическое повреждение миокарда сопровождается гипертрофией правого желудочка, деструктивными изменениями ядер кардиомиоцитов и субтотальной вакуолизацией ультраструктур саркоплазмы, связанными с пролонгированными гемодинамическими нарушениями и уменьшением уровня реакции на маркеры сократительной способности миокарда.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.В. Кулида.
Сбор и обработка материала – М.В. Малышева.
Написание текста – М.В. Малышева, Л.В. Кулида, Е.В. Проценко.
Редактирование – Е.В. Проценко.

Author contributions.

Concept and design of the study – L.V. Kulida.
Collection and processing of material – M.V. Malysheva.
Writing of the text – M.V. Malysheva, L.V. Kulida, E.V. Prochenko.
Editing – E.V. Prochenko.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Прахов А.В. Неонатальная кардиология: Руководство для врачей. 2-е изд. Нижний Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2017. 464 с.
Prakhov AV. Neonatal cardiology: A guide for doctors. 2nd ed. Nizhny Novgorod: Nizhegorodskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya Publ., 2017. 464 p. (In Russ.).
2. Черняева В.И., Зотова О.А., Шакирова Е.А., Колесникова Н.Б., Чуйкова А.С., Крючкова О.Г. Состояние здоровья новорожденных с экстремально низкой массой тела. Мать и Дитя в Кузбассе. 2019;4(79):40–46. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41514669> (получено 20.02.2025).
Chernyaeva VI, Zotova OA, Shakirova EA, Kolesnikova NB, Chuykova AS, Kryuchkova OG. Health condition of extremely low birth weight infants. Mother and Baby in Kuzbass. 2019;4(79):40–46 (In Russ.). Available from: https://elibrary.ru/item.asp?id=41514669 (accessed 20.02.2025).
3. Ваземиллер О.А., Ваганов А.А., Голубенко Н.К., Аксанова Р.Х., Салмина А.Б., Емельяничук Е.Ю. Диагностика повреждений миокарда у недоношенных детей с транзиторной ишемией сердца в раннем неонатальном периоде. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2019;64(5):38–43. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-5-38-43.
Vazemiller OA, Vaganov AA, Golubenko NK, Aksanova RK, Salmina AB, Emelyanchik EYu. Diagnostics of myocardial damage in premature newborns with transient heart disease in the early neonatal period. Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics = Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii. 2019;64(5):38–43 (In Russ.). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-5-38-43.
4. Триль Е.В., Буруцкая А.В. Метаболическая кардиомиопатия в практике педиатра. Кубанский научный медицинский вестник. 2019;26(4):107–122. DOI: 10.25207/1608-6228-2019-26-4-107-122.
Tril EV, Burlutskaya AV. Metabolic cardiomyopathy in pediatric practice. Kuban Scientific Medical Bulletin. 2019;26(4):107–122 (In Russ.). DOI: 10.25207/1608-6228-2019-26-4-107-122.
5. Третьякова О.С., Заднипрый И.В. Биоэнергетика миокарда в условиях гипоксии: возрастные аспекты. Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2020;4(1):52–62. DOI: 10.17116/operhirurg2020401152.
Tretyakova OS, Zadnipyryany IV. Myocard bioenergy under hypoxia: age-related aspects. Russian Journal of Operative Surgery and Clinical Anatomy. 2020;4(1):52–62 (In Russ.). DOI: 10.17116/operhirurg2020401152.
6. Юсенко С.Р., Траль Т.Г., Толибова Г.Х., Коган И.Ю. Морфологические особенности плацент при хронической плацентарной недостаточности и задержке роста плода. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2022;21(3):95–101. DOI: 10.20953/1726-1678-2022-3-95-101.
Yusenko SR, Tral TG, Tolibova GK, Kogan IYu. Placental morphology in chronic placental insufficiency and fetal growth restriction. Gynecology, Obstetrics and Perinatology. 2022;21(3):95–101 (In Russ.). DOI: 10.20953/1726-1678-2022-3-95-101.

7. Беженарь В.Ф., Иванова Л.А., Татарова Н.А. Хроническая плацентарная недостаточность: клиника, диагностика и лечение. Российский вестник акушера-гинеколога. 2020;20(6):32–39. DOI: 10.17116/rosakush20202006132.
Bezhenar VF, Ivanova LA, Tatarova NA. Chronic placental insufficiency: clinical picture, diagnosis and treatment. Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist = Rossiyskii Vestnik Akushera-Ginekologa. 2020;20(6):32–39 (In Russ.). DOI: 10.17116/rosakush20202006132.
8. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. Am J Obstet Gynecol. 2018;218(2S):S745–61. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
9. Печерина Т.Б., Кутихин А.Г. Биомаркеры фиброза миокарда и их генетическое регулирование у пациентов с сердечной недостаточностью. Российский кардиологический журнал. 2020;25(10):139–144. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3933.
Pecherina TB, Kutikhin AG. Biomarkers of myocardial fibrosis and their genetic regulation in patients with heart failure. Russian Journal of Cardiology. 2020;25(10):139–144 (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3933.
10. Чаулин А.М., Карслян Л.С., Григорьева Е.В., Нурбалтаева Д.А., Дупляков Д.В. Клинико-диагностическая ценность кардиомаркеров в биологических жидкостях человека. Кардиология. 2019;59(11):66–75. DOI: 10.18087/cardio.2019.11.n414.
Chaulin AM, Karslyan LS, Grigorieva EV, Nurbaltaeva DA, Duplyakov DV. Clinical and diagnostic value of cardiac markers in human biological fluids. Kardiologiya. 2019;59(11):66–75 (In Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2019.11.n414.
11. Дымова О.В. Современные биомаркеры в кардиологии. Медицинский совет. 2018;16:118–123. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-16-118-123.
Dymova OV. Modern biomarkers in cardiology. Medical Council = Meditsinskiy sovet. 2018;16:118–123 (In Russ.). DOI: 10.21518/2079-701X-2018-16-118-123.
12. Кулева Н.В., Красовская И.Е. Новая роль миоглобина в функционировании сердечной и скелетной мышц. Биофизика. 2016;61(5):861–864. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27327334> (получено 20.02.2025).
Kuleva NV, Krasovskaya IE. A new role of myoglobin in cardiac and skeletal muscle function. Biophysics = Biofizika. 2016;61(5):861–864 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27327334> (accessed 20.02.2025).
13. Курияк М.М., Ожгибесова М.А., Ганеева Е.Р. Лабораторные маркеры повреждения миокарда в современной кардиологии. Научное обозрение. Педагогические науки. 2019;5-3:85–89. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41297180> (получено 20.02.2025).
Kyriyak MM, Ozhgibesova MA, Ganeeva ER. Laboratory markers of myocardial damage in modern cardiology. Scientific Review. Pedagogical Sciences = Nauchnoe obozrenie. Pedagogicheskie nauki. 2019;5-3:85–89 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41297180> (accessed 20.02.2025).
14. Чаулин А.М., Карслян Л.С., Григорьева Е.В., Нурбалтаева Д.А., Дупляков Д.В. Особенности метаболизма сердечных тропонинов (обзор литературы). Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2019;8(4):103–115. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-4-103-115.
Chaulin AM, Karslyan LS, Grigorieva EV, Nurbaltaeva DA, Duplyakov DV. Metabolism of cardiac troponins (literature review). Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2019;8(4):103–115 (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-4-103-115.
15. Alvarado-Socarrás JL, Manrique-Hernández EF. Cardiac Troponin-T as a marker of myocardial dysfunction in term neonates with perinatal asphyxia: correspondence. Indian J Pediatr. 2019;86(8):766–7. DOI: 10.1007/s12098-019-02884-w.
16. Marston S, Zamora JE. Troponin structure and function: a view of recent progress. J Muscle Res Cell Motil. 2020;41(1):71–89. DOI: 10.1007/s10974-019-09513-1.
17. Frangogiannis NG. The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium. J Thorac Dis. 2017;9 (Suppl 1):S52–63. DOI: 10.21037/jtd.2016.11.19.
18. Кулида Л.В., Малышева М.В., Перетятко Л.П., Сарыева О.П., Проценко Е.В. Патоморфология гипоксически-ишемических повреждений миокарда у новорожденных на 22–27 неделе гестации. Архив патологии. 2021;83(4):29–34. DOI: 10.17116/patol20218304129.
Kulida LV, Malysheva MV, Peretyatko LP, Saryeva OP, Protsenko EV. Morphopathology of myocardial hypoxic-ischemic injuries in newborns at 22–27 weeks' gestation. Russian Journal of Archive of Pathology = Arkhiv Patologii. 2021;83(4):29–34 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20218304129.
19. Sabatasso S, Moretti M, Mangin P, Fracasso T. Early markers of myocardial ischemia: from the experimental model to forensic pathology cases of sudden cardiac death. Int J Legal Med. 2018;132(1):197–203. DOI: 10.1007/s00414-017-1605-7.
20. Шевченко Ю.Л., Плотницкий А.В., Судилова В.В., Дубова Е.А., Ульяшев Д.С. Морфология и маркеры иммобилизирующего интерстициального фиброза сердца. Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2022;17(3):84–93. DOI: 10.25881/20728255_2022_17_3_84.
Shevchenko YuL, Plotnitsky AV, Sudilovskaya VV, Dubova EA, Ulbashev DS. The morphology and markers of the immobilizing interstitial fibrosis of the heart. Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center. 2022;17(3):84–93 (In Russ.). DOI: 10.25881/20728255_2022_17_3_84.
21. Траль Т.Г., Мацкевич В.Б. Динамика развития клапанных отверстий желудочков сердца плода. Архив патологии. 2010;72(6):51–52. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16383226> (получено 20.02.2025).
Tral TG, Matskevich VB. Trend in the development of fetal ventricular valve ostia. Russian Journal of Archive of Pathology = Arkhiv Patologii. 2010;72(6):51–52 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16383226> (accessed 20.02.2025).
22. Мацкевич В.Б. Методика раздельного вскрытия сердца плодов и новорожденных. Архив патологии. 2005;67(1):51–53. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9133582> (получено 20.02.2025).
Matskevich VB. Method of separate heart section of fetuses and newborns. Russian Journal of Archive of Pathology = Arkhiv Patologii. 2005;67(1):51–53 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9133582> (accessed 20.02.2025).

Информация об авторах

Мария Вячеславовна Малышева – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова.

Людмила Викторовна Кулида – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова.

Елена Васильевна Проценко – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова.

Author information

Maria V. Malysheva – Junior Researcher, Laboratory of Pathomorphology and Electron Microscopy, V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood.

<https://orcid.org/0000-0001-7479-4665>

Ludmila V. Kulida – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Pathomorphology and Electron Microscopy, V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood.

<https://orcid.org/0000-0001-8962-9048>

Elena V. Prochenko – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Pathomorphology and Electron Microscopy, V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood.

<https://orcid.org/0000-0003-0490-5686>

© Godovalova O.S., Proshchina A.E., Kharlamova A.S., Krivova Yu.S., Saveliev S.V., 2025

DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.69-77

Comparative analysis of cortical maturation in sulci and gyri of the visual cortex during human late prenatal and postnatal periods

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

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

Abstract. Introduction. The formation and maturation of the cortical plate in the sulci and gyri of the human brain are incompletely understood. To evaluate the maturation pattern of the gyrified cortex, the distribution of immunohistochemical markers for synaptic activity and mature neurons in the human visual cortex was investigated during the late fetal and postnatal periods.

Materials and methods. We analyzed 14 human post-mortem brain samples. The distribution of GAD65/67, GAT-1, and NeuN in sulcal and gyral regions and sulcal banks was examined using immunohistochemistry.

Results. Cortical maturation proceeds in clusters, representing second-order functional neural assemblies. The cortical regions of sulcal banks and gyri mature earlier followed by maturation of the cortex within the sulci.

Conclusion. The gyrified cortex exhibits asynchronous maturation with the regions at the boundaries of sulci and gyri reaching maturity earlier than sulcal regions. There is a complex interplay between gyrification and cortical maturation, indicating a strong link between the structural organization of the cortex and its functional development.

Keywords: visual field, cerebral maturation, gyrification, sulci, gyri, human brain development, GAD65/67, GAT-1, NeuN

Corresponding author: Olga S. Godovalova. E-mail: godovalova.brain@gmail.com

For citation: Godovalova O.S., Proshchina A.E., Kharlamova A.S., Krivova Yu.S., Saveliev S.V. Comparative analysis of cortical maturation in sulci and gyri of the visual cortex during human late prenatal and postnatal periods. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):69–77. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.69-77.

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. FURG-2025-0031).

Received 22.04.2025. **Received in revised form** 02.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

УДК: 611.81.013

Сравнительный анализ созревания борозд и извилин зрительной коры в поздний пренатальный и постнатальный период развития человека

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

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

Резюме. Введение. Процессы формирования и созревания корковой пластинки внутри борозд и извилин головного мозга человека остаются не до конца изученной областью нейронауки. Для оценки характера созревания гирифицированной коры проведено иммуногистохимическое исследование распределения маркеров синаптической активности и маркера зрелых нейронов в зрительной коре головного мозга в позднефетальном и постнатальном периоде.

Материалы и методы. Проанализировали 14 аутопсийных образцов головного мозга человека. Проведено иммуногистохимическое окрашивание с антителами GAD65/67, GAT-1, NeuN с последующим сравнением распределения перечисленных маркеров в области борозд, губ борозд и извилин затылочной доли головного мозга.

Результаты. Установлено, что созревание коры протекает кластерами – функциональными нейронными объединениями второго порядка. Было показано более раннее созревание коры в области губ борозд и извилин и более позднее внутри борозд.

Заключение. Продemonстрировано асинхронное созревание гирифицированной коры, при этом области на границах борозд и извилин созревали раньше, чем области борозд. Подчеркнуто сложное взаимодействие между гирификацией и созреванием коры, указывающее на прочную связь между структурной организацией коры и ее функциональным развитием.

Ключевые слова: зрительное поле, созревание головного мозга, гирификация, борозды, извилины, развитие головного мозга человека, GAD65/67, GAT-1, NeuN

Для корреспонденции: Ольга Сергеевна Годовалова. E-mail: godovalova.brain@gmail.com

Для цитирования: Годовалова О.С., Прошина А.Е., Харламова А.С., Кривова Ю.С., Савельев С.В. Сравнительный анализ созревания борозд и извилин зрительной коры в поздний пренатальный и постнатальный период развития человека. Клин. эксп. морфология. 2025;14(5):69–77. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.69-77.

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» (№ FURG-2025-0031).

Статья поступила 22.04.2025. Получена после рецензирования 02.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

Introduction

Studies on the maturation of the human neocortex represent an important area of neurobiological research. The gray matter is crucial for integrating sensory information, memory formation, and higher-order thinking skills. Understanding the mechanisms of cerebral cortex maturation may help identify the causes of neurological and psychiatric disorders such as autism spectrum disorder and schizophrenia. Investigations into age-related and individual differences in cortical maturation could contribute to developing effective diagnostic and intervention strategies for cognitive and emotional development.

A key characteristic of human neocortex development is its pronounced gyrification. Broader cortical maturation and the processes underlying sulcus and gyrus formation remain poorly understood in neuroscience.

Our previous findings indicate that cortical plate formation progresses more slowly within sulci than within gyri of the same cytoarchitectonic field during early and middle fetal periods [1]. The study focused on the visual cortex, particularly the calcarine sulcus (primary visual field 17) and parieto-occipital sulcus (secondary visual field 18). This region was selected due to its accelerated synaptogenesis observed within the visual cortex [2, 3] and stable association between these sulci and their respective cytoarchitectonic fields [4].

Neuronal maturity markers include synaptic activity markers, NeuN, GAD65/67, and GAT-1.

Glutamate decarboxylase (GAD), an enzyme responsible for synthesizing γ -aminobutyric acid (GABA), is the most prevalent inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of higher vertebrates [5]. GAD exists in two isoforms—GAD65 and GAD67, named for their molecular weights, which function synchronously to produce and regulate physiological GABA levels [5].

The GABA transporter 1 (GAT-1) is the primary GABA transporter in the brain that plays a crucial role in modulating GABAergic transmission. It is predominantly found in axon terminals forming symmetrical synapses and astrocytic processes [6].

NeuN is a marker for most postmitotic neuroblasts and mature neurons in vertebrate animals [7].

To assess cortical maturity in the sulcus, gyrus, and sulcal banks of the visual cortex, we analyzed the distribution of GAD65/67, NeuN, and GAT-1 using immunohistochemistry.

Materials and methods

This study used autopsy specimens from the archival collection of the Laboratory of Nervous System Development of Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery.” The study was approved by the local Ethics Committee (No. 33(9), February 7, 2022). Fourteen post-mortem human brain samples were analyzed: (1) six late-fetal period specimens (29–40 gestational weeks); (2) six pediatric samples (1 day–4 years); and (3) two adult samples (48 and 70 years). Gestational age was calculated from the last menstrual period, verified by ultrasound examination, and supplemented with anthropometric parameters (weight/height and crown-rump length) [8]. Our analysis included samples without clinical records indicating chromosomal anomalies or CNS pathology. Samples for immunohistochemical analysis were selected after histological assessment of material preservation. We excluded samples with hemorrhages, necrosis, or signs of post-mortem autolysis, as well as samples with prolonged storage in formalin due to the potential impact on immunoreactivity distribution. The data on human occipital lobe formation at earlier developmental stages are available on the Human Brain Development Atlas project website at <https://brainmorphology.science> [9, 10].

Histological preparation and immunohistochemistry

All brain samples underwent histological processing. Depending on the fetal age, we examined either the whole brain or a region of the medial wall of the hemisphere encompassing the calcarine sulcus (*sulcus calcarinus*, Cas) and parieto-occipital sulcus (*sulcus parietooccipi-*

*tal*is, Pos). Samples were immersion-fixed in either 10% neutral buffered formalin (pH 7.0–7.4) or Bouin's solution, followed by dehydration in graded ethanol solutions and dioxane. Tissues were then paraffin-embedded and sectioned at 10- μ m thickness. Sections were stained with classic histological cresyl violet (Nissl stain) for cytoarchitectural analysis and mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at 4°C. Immunohistochemical analysis was performed using primary antibodies targeting nervous system antigens: NeuN (Millipore, RRID: AB_2298772, Germany) at a dilution of 1:100, GAT-1 (Millipore, RRID: AB_90791, Germany) at a dilution of 1:100, and GAD65/67 (Thermo Fisher Scientific, RRID: AB_930942, USA) at a dilution of 1:50. For immunohistochemical labeling, sections were deparaffinized, rehydrated, boiled in citrate buffer (pH 6.0; DiaGene, Russia) for 10 min, and incubated with primary antibodies diluted in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3–7.5; Biolot, Saint Petersburg, Russia) for 1 h at room temperature for NeuN and GAT-1 and for 18–20 h at 8°C for GAD65/67. Visualization was achieved with The Ultra Vision LP Detection System (Thermo Fisher Scientific, USA). Negative control sections were obtained by replacing the primary antibodies with PBS (0.01 M). Non-specific staining was absent in all control sections.

Statistical analysis

We analyzed all specimens under a light microscope (DM 2500; Leica Microsystems, Germany) connected to a digital camera (Lomo, Russia). Images were acquired and processed using McrA-View 7.1.1.2 software (Lomo, Russia). Measurements were performed on photomicrographs of the specimens. We scanned some specimens using a modified MEKOS-C2 complex (MEKOS, Russia) based on a Zeiss Axio Imager 1 microscope (Carl Zeiss, Germany) with a 20x objective. We analyzed 10 non-overlapping observation fields from 3–5 sections per region. The immunoreactivity coefficient was calculated using ImageJ software ver. 1.43 as the ratio of the sum of immunopositive (colored) pixels to the total number of pixels in the selected area.

For statistical analysis, we divided cases into three groups: late fetal (29–40 weeks), postnatal, and adult periods. The immunoreactivity coefficient values were compared in the cortical sulci, sulcal banks, and gyri. Statistical analysis was performed using Statistica 10 software (StatSoft, USA) employing the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA with post-hoc multiple comparisons of mean ranks.

Results

Distribution of NeuN immunoreactivity

In the late fetal period, NeuN-positive cells were in all layers of the cortical plate on the brain surface, both in gyri and sulcal banks (Fig. 1 A). The NeuN immunoreactivity coefficient was significantly higher in sulcal banks than

in the sulci [$p=0.000000$] (Fig. 1 B). Within the sulci, the frequency of NeuN-positive cells gradually decreased from layer II to layer VI. Notably, NeuN-positive cells were predominantly localized in layer VI of the calcarine sulcus. The cortex within the parieto-occipital sulcus showed no specific layer in NeuN immunoreactivity.

In the postnatal period, the above-described trends in marker distribution were detected, which persisted from birth until 4 years postnatally. More intense staining was observed in the gyri cortex, where labeled neurons were found in all cortical layers. In the depth of the sulci, NeuN immunoreactivity was low in both areas 17 and 18.

A distinct pattern of NeuN-immunopositive cell distribution was observed at 10 months postnatally (Fig. 1 C, D). Within the sulcus, NeuN-immunopositive cells formed morphological and functional neural assemblies, predominantly in layer II with partial extension to layer III of the neocortex, and additional clusters in layers V and VI. These assemblies measured 250 μ m in width in layer II and 210 μ m in layer VI.

In adults, NeuN-positive neurons were found throughout the primary and secondary visual fields, with no difference in distribution in the gyri, sulcal banks, and sulcal depths.

Thus, we detected asynchronous maturation of NeuN immunoreactivity in the sulci and gyri, persisting until 4 years postnatally (Fig. 1 B, E, F).

Distribution of GAD65/67-immunoreactivity

In the late fetal period, a small number of GAD65/67-immunoreactive cells were observed in the cortex. Approaching birth, GAD65/67-immunoreactivity intensified, with a significantly higher coefficient being in the sulcal bank cortex compared to that in the gyri cortex and the cortex within the sulci within the same cytoarchitectonic fields (Fig. 2 A, B, C). In area 17, immunoreactivity was mainly localized in layers IVC and V–VI. Layers IVB and IVA had dense groups of neurons and revealed the structure of functional neuronal assemblies. Areas 18 and 19 showed strong immunoreactivity in layers II and upper layer III (Fig. 2 A, B, C), with occasional morphological and functional assemblies found in the lower layer III and layer IV. The width of the assemblies at layer IV averaged 190 μ m.

Postnatally, the GAD65/67-immunoreactivity coefficient increased, particularly in gyri and sulcal banks (Fig. 2 D, E), with its statistically significant differences observed in the cortex of sulcal banks, gyri, and sulci (Fig. 2 F).

These findings demonstrate that GAD65/67 successfully captured transient cortical assemblies in newborns and revealed heterogeneity of cortical maturation in sulci, gyri, and sulcal banks.

Distribution of GAT-1 immunoreactivity

In the late fetal period, GAT-1-immunopositive fibers were distributed across the entire hemisphere wall, mainly

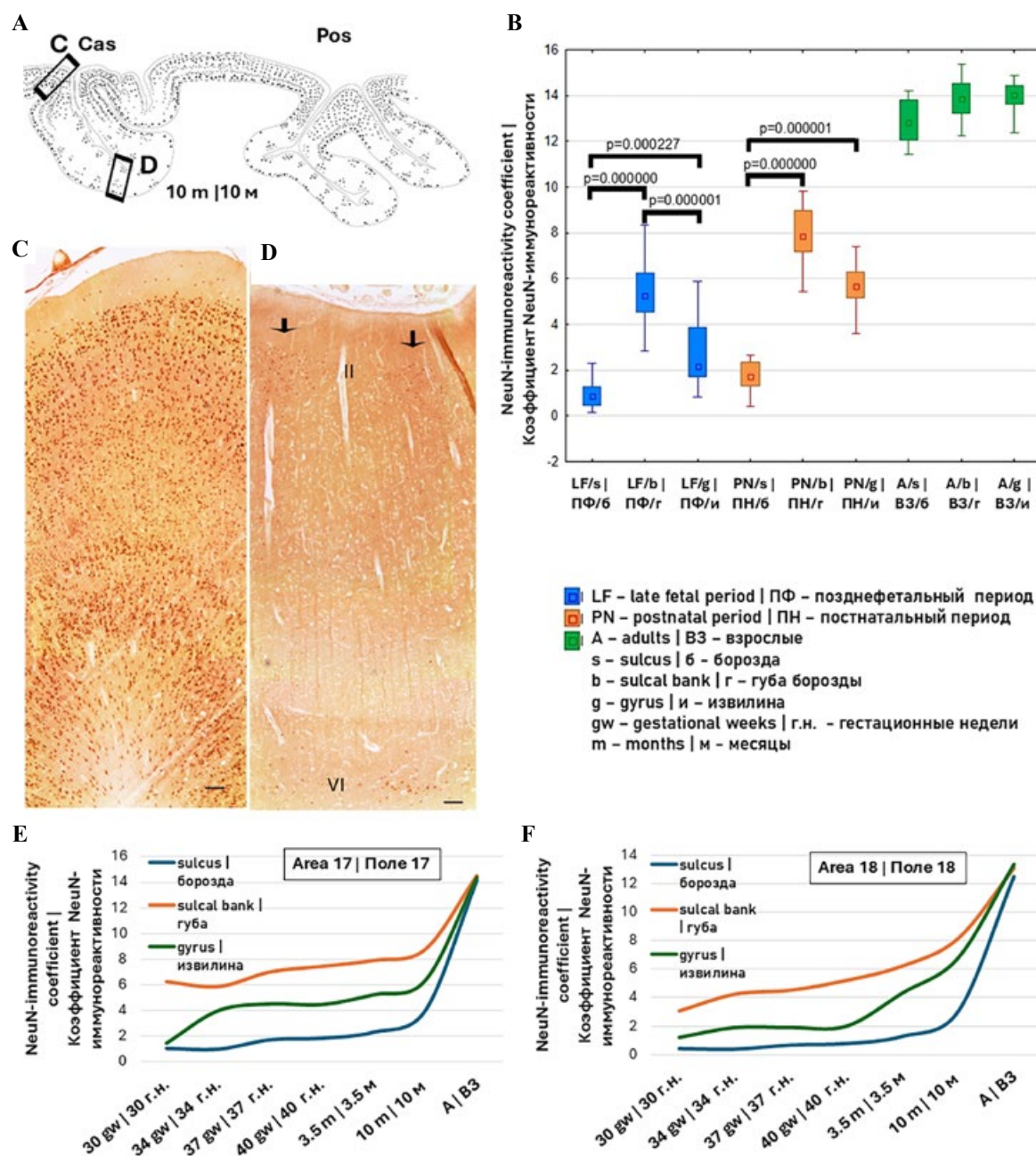


Fig. 1. A – the distribution of NeuN-immunoreactive cells in the occipital cortical plate, 10-month-old infant. B – boxplots and multiple comparisons for the NeuN-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the occipital lobe at three locations: sulcus, sulcal bank, and gyrus, areas 17 (calcarine sulcus) and 18 (parieto-occipital sulcus). Comparable periods: late fetal period (LF), postnatal period (PN), adults (A). Significant differences between locations are marked by brackets. C – NeuN-immunohistochemical staining, a region of the cortical plate at the sulcal bank of the calcarine sulcus, area 17, 10-month-old infant. D – NeuN-immunohistochemical staining, a region of the cortical plate within the calcarine sulcus, area 17, 10-month-old infant. E – mean NeuN-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 17. F – mean NeuN-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 18. Scale bar: 100 μ m

Рис. 1. А – схема распределения NeuN-иммунореактивных клеток в коре затылочной доли у 10-месячного ребенка. В – диаграммы размаха и множественное сравнение коэффициента NeuN-иммунореактивности в кортикальной пластинке затылочной доли в трех областях: борозда, губа борозды и извилина, поля 17 (шпорная борозда) и 18 (теменно-затылочная борозда). Сравнимые периоды: поздний фетальный период (LF), постнатальный период (PN), взрослые (A). Значимые различия между областями отмечены квадратными скобками. С – NeuN-иммуногистохимическое окрашивание, область кортикальной пластинки в губе шпорной борозды, поле 17, 10-месячный ребенок. D – NeuN-иммуногистохимическое окрашивание, область кортикальной пластинки внутри шпорной борозды, поле 17, 10-месячный ребенок. E – график средних значений коэффициента NeuN-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 17. F – график средних значений коэффициента NeuN-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 18. Масштабная линейка: 100 мкм

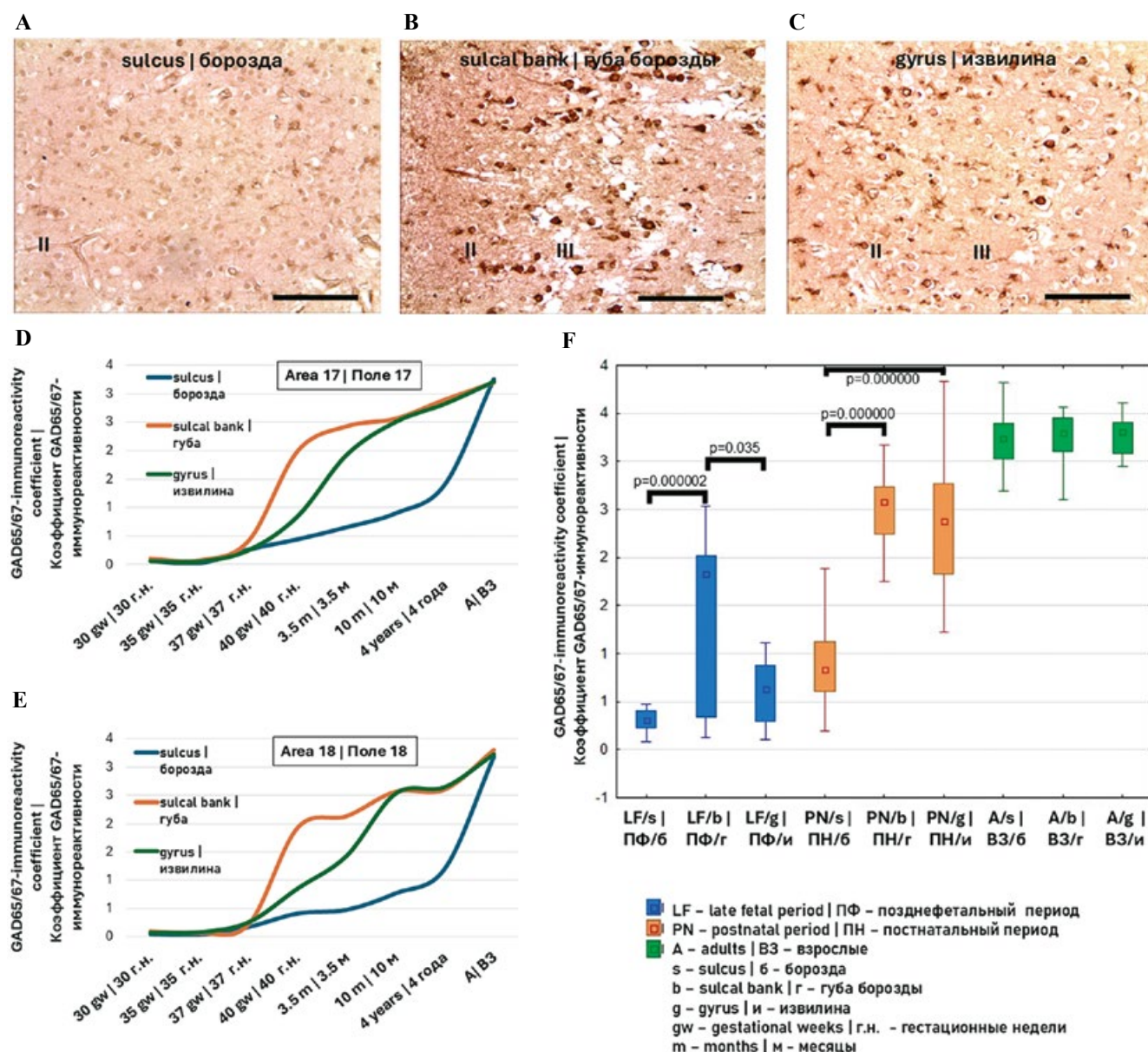


Fig. 2. GAD65/67 immunohistochemical staining of a coronal section of the human occipital lobe neocortex, 40 gestational weeks. A – a region of the cortical plate within the parieto-occipital sulcus, area 18. B – a region of the cortical plate at the bank of the parieto-occipital sulcus, area 18. C – a region of the cortical plate in the lingual gyrus, area 18. D – mean GAD65/67-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 17. E – graph of mean GAD65/67-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 18. F – boxplots and multiple comparisons for the GAD65/67-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the occipital lobe at three locations: sulcus, sulcal bank, and gyrus, areas 17 (calcarine sulcus) and 18 (parieto-occipital sulcus). Comparable periods: late fetal period (LF), postnatal period (PN), adults (A). Significant differences between locations are marked by brackets. Scale bar: 100 μ m

Рис. 2. GAD65/67-иммуногистохимическое окрашивание коронарного среза неокортекса затылочной доли плода человека на 40-й неделе гестации (gw).

А – область кортикальной пластинки внутри теменно-затылочной борозды, поле 18. В – область кортикальной пластинки в губе теменно-затылочной борозды, поле 18. С – область кортикальной пластинки в язычной извилине, поле 18. D – график средних значений коэффициента GAD65/67-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 17. E – график средних значений коэффициента GAD65/67-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 18. F – диаграммы размаха и множественное сравнение коэффициента GAD65/67-иммунореактивности в кортикальной пластинке затылочной доли в трех областях: борозда, губа борозды и извилина, поля 17 (шпорная борозда) и 18 (теменно-затылочная борозда). Сравнимые периоды: поздний фетальный период (LF), постнатальный период (PN), взрослые (A). Значимые различия между областями отмечены квадратными скобками. Масштабная линейка: 100 мкм

localizing in the marginal zone. A cytoarchitectonically specific pattern of immunopositive fiber arrangement in the marginal zone was noticeable. GAT-1 immunoreactivity of the cortex was the highest in the sulcal banks and gyri, with GAT-1 immunoreactivity decreasing when moving deeper into the sulci (Fig. 3 A, D). In area 17, the lower cortical layers and marginal zone showed prolonged immunohistochemical labeling, whereas in areas 18–19, the upper layers and marginal zone maintained stronger immunoreactivity over time. Postnatally, GAT-1 immunoreactivity in the sulcal bank cortex and the gyri cortex was comparable (Fig. 3 B, E). GAT-1 immunoreactivity in the sulcal cortex was significantly lower until 4 years postnatally (Fig. 4 A, B, C).

In adults, GAT-1-immunopositive fibers were primarily found in the cortex, with predominant labeling being in layer I. In adults, we observed no reduction in labeling within the sulci (Fig. 3 C, F).

GAT-1 immunoreactivity demonstrates that the gyri cortex and the sulcal bank cortex mature earlier than the cortex within the sulci. The delayed maturation of the sulci cortex persists until at least 4 years of age.

Discussion

Distribution of GAT-1, GAD65/67, and NeuN markers

Several studies have identified age-related changes in the levels of the synaptic activity markers GAT-1 [11] and GAD [12–14].

Our findings demonstrate predominant localization of the GAT-1 transporter to the marginal zone, consistent with earlier studies of the human neocortex [11]. However, due to the limited sample size, age-related changes could not be confirmed.

Literature reports significant changes in the GAD65 isoform expression but not in the GAD67 one [12]. Our study demonstrates the predominance of neuron body labeling, i.e., the GAD67 isoform labeling, in the late fetal period and newborns. According to the literature, this isoform appears earlier than others during human and animal ontogenesis [13, 14]. In the adult human cortex, immunolabeling revealed a predominance of fine, small fibers, i.e., GAD65 isoform, which is consistent with published data [13]. The quantity of the GAD67 isoform is likely to depend on the functional load of certain neu-

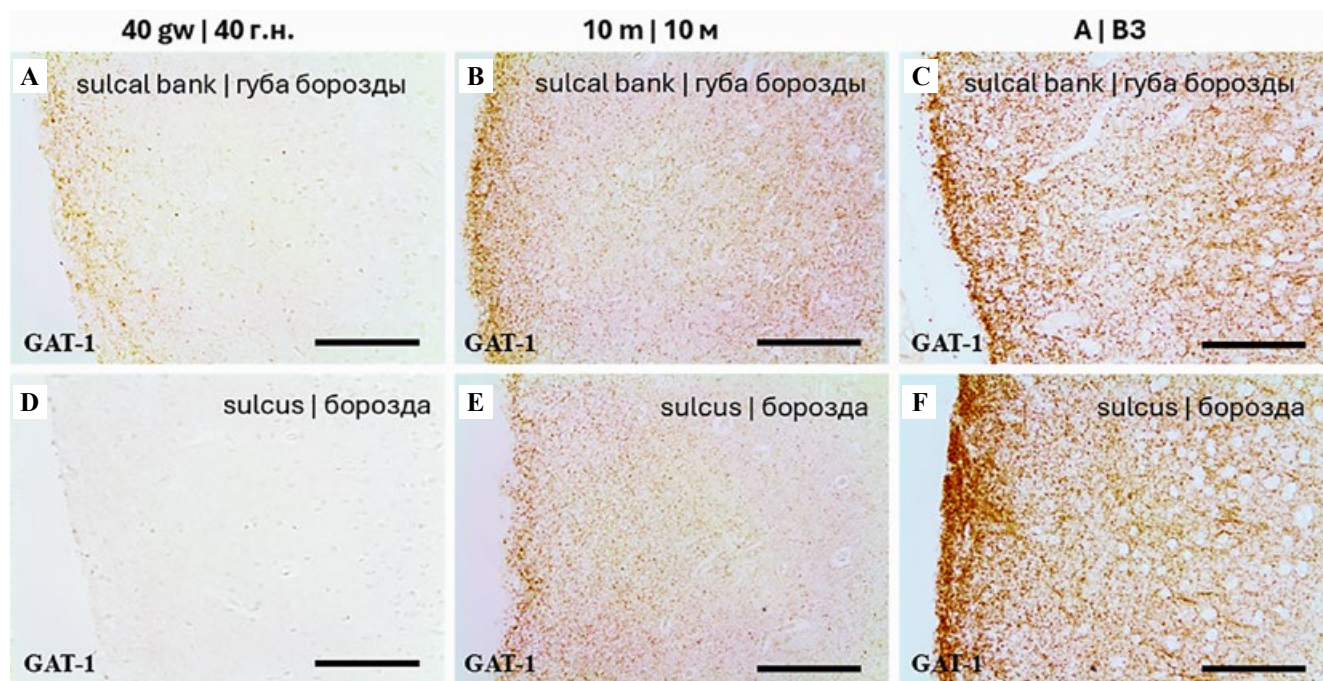


Fig. 3. GAT-1 immunohistochemical staining of a coronal section of the human occipital lobe.

A – a region of the marginal zone, cortical plate at the bank of parieto-occipital sulcus, area 18, 40 gestational weeks (gw).

B – a region of the marginal zone, cortical plate at the bank of parieto-occipital sulcus, area 18, 10-month-old (m) infant.

C – a region of the marginal zone, cortical plate at the bank of parieto-occipital sulcus, area 18, adult (A). D – a region of the

marginal zone, cortical plate within the parieto-occipital sulcus, area 18, 40 gw. E – a region of the marginal zone, cortical plate

within the parieto-occipital sulcus, area 18, 10-month-old infant. F – a region of the marginal zone, cortical plate within the

parieto-occipital sulcus, area 18, adult. Scale bar: 100 μ m

Рис. 3. GAT-1-иммуногистохимическое окрашивание коронарного среза затылочной доли человека.

А – область маргинальной зоны, кортикальная пластинка в губе теменно-затылочной борозды, поле 18, 40 недель

гестации. В – область маргинальной зоны, кортикальная пластинка в губе теменно-затылочной борозды, поле 18,

10-месячный (м) ребенок. С – область маргинальной зоны, кортикальная пластинка в губе теменно-затылочной борозды,

поле 18, взрослый (ВЗ). Д – область маргинальной зоны, кортикальная пластинка внутри теменно-затылочной

борозды, поле 18, 10-месячный ребенок. Е – область маргинальной зоны, кортикальная пластинка внутри теменно-

затылочной борозды, поле 18, взрослый. Масштабная линейка: 100 мкм

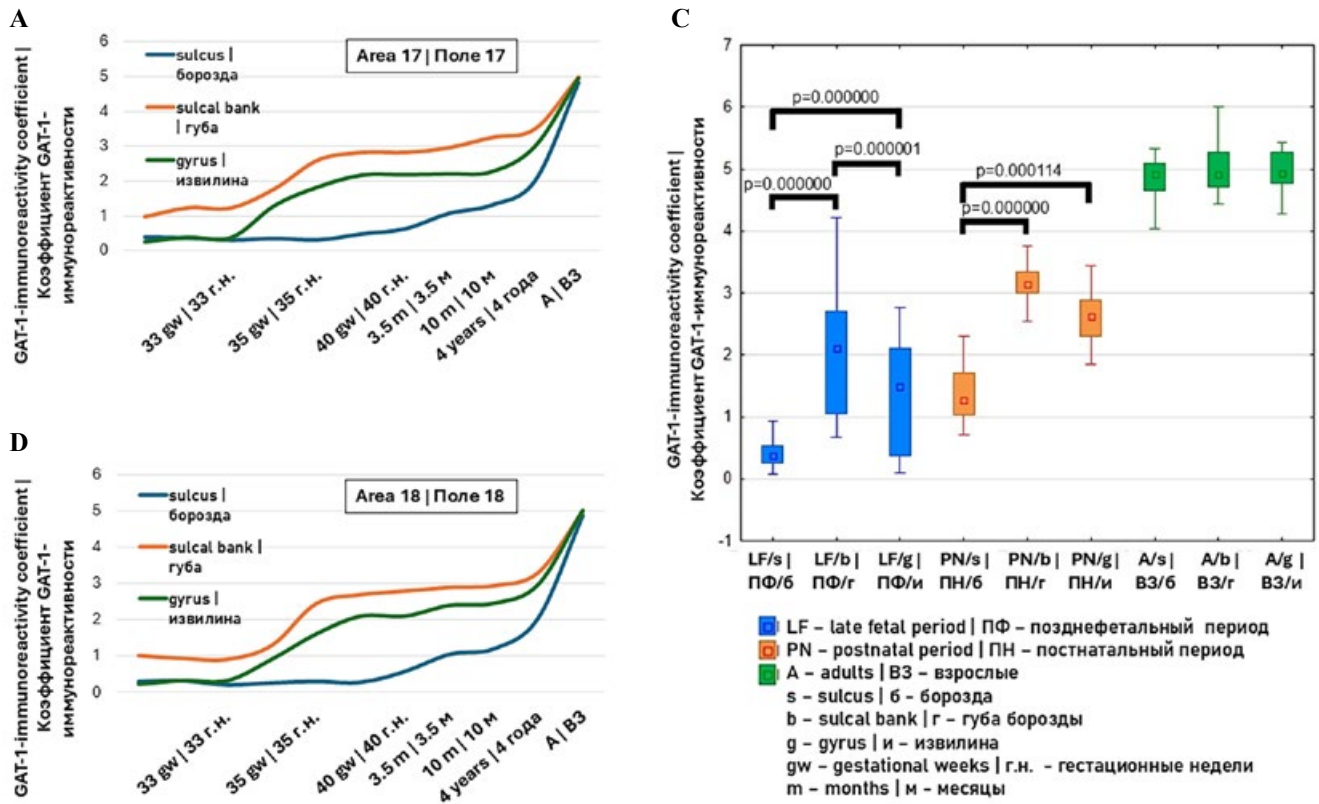


Fig. 4. A – mean GAT-1-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 17. B – mean GAT-1-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the sulcus, sulcal bank, and gyrus as a function of age, area 18. C – boxplots and multiple comparison for the GAT-1-immunoreactivity coefficient in the cortical plate of the occipital lobe at three locations: sulcus, sulcal bank, and gyrus, areas 17 (calcarine sulcus) and 18 (parieto-occipital sulcus). Comparable periods: late fetal period (LF), postnatal period (PN), adults (A). Significant differences between locations are marked by brackets

Рис. 4. А – график средних значений GAT-1-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 17. В – график средних значений GAT-1-иммунореактивности в кортикальной пластинке борозды, губы борозды и извилины в зависимости от возраста, поле 18. С – диаграммы размаха и множественное сравнение коэффициента GAT-1-иммунореактивности в кортикальной пластинке затылочной доли в трех областях: борозда, губа борозды и извилина, поля 17 (шпорная борозда) и 18 (теменно-затылочная борозда). Сравнимые периоды: поздний фетальный период (LF), постнатальный период (PN), взрослые (A). Значимые различия между областями отмечены квадратными скобками

rons. A similar dependence was confirmed for the GAD65 isoform [15].

This paper reveals differing immunoreactivity to GAT-1, GAD65/67, and NeuN in sulci, sulcal banks, and gyri. We showed higher immunoreactivity coefficient values in sulcal banks and gyri in the late fetal period, which continued in the postnatal period until 4 years postnatally. In the adult samples, we observed no heterogeneity in the distribution of the markers in the cortex of sulci and gyri.

Neocortical neurons from vertical columnar assemblies span all cortical layers. Neurons within a column process signals of a single modality [16], a functional architecture established in early cortical development. Each column contains cells derived from multiple clones of a common origin [17]. In the adult brain, these columns group into larger second-order assemblies—macrocolumns—which typically consist of 3–12 columns [18].

Previous studies visualized macrocolumns with GAD67 immunohistochemistry in both the developing and mature

rat brain [19]. In cats, transient visualization of second-order morphological and functional structures was observed with the labeling of excitatory receptors NMDAR1 during normal brain development [20].

Our findings reveal second-order morphological and functional assemblies in the human neonatal cortex using GAD labeling. In newborns, GAD-immunopositive neuron bodies were found in area 17.

Additionally, NeuN labeling has temporarily revealed morphological and functional assemblies in a 10-month-old infant, localized within the sulci of the neocortex. *In vivo* imaging in mice demonstrated that prospective interneurons form patches of correlated activity that merge during postnatal development. This functional organization changes rapidly in two steps: by the end of the postnatal week, GABA assemblies form; two days later, these assemblies merge into a fully connected functional network [21]. As a result, the clustered functional organization of the cortex is a transient developmental stage in mice. The persistence

of morphological features of the clustered organization within the sulci in the human neocortex at 10 months may indirectly indicate a slower maturation rate in these regions.

Thus, immunohistochemical labeling of GAD65/67 and NeuN shows that cortical maturation progresses in clusters, representing second-order functional neural assemblies. Comparative analysis using GAT-1, GAD65/67, and NeuN markers indicates a more accelerated cortical maturation in the sulcal banks and gyri than in the cortex within the sulci.

Conclusion

This research studied the complex maturation of the human cerebral cortex within sulci and gyri during late fetal and postnatal development, thus addressing a significant gap in our understanding of neocortical formation. Cortical maturation progresses heterogeneously and is characterized by the formation of second-order functional neural assemblies, as visualized using GAD65/67 and NeuN markers. Specifically, cortical regions of sulcal banks and gyri mature earlier than the sulci, as confirmed by the distribution patterns of GAT-1, GAD65/67, and NeuN. These data indicate a differentiated maturation pattern in the gyrified cortex, where regions at the boundaries of sulci and gyri were shown to mature earlier than sulcal regions.

The paper highlights the complex interplay between gyrification and cortical maturation, suggesting a strong link between the cortical structural organization and its functional development. Future research should elucidate the mechanisms underlying heterogeneity in cortical maturation and investigate their functional consequences. These studies could provide a more comprehensive understanding of normal brain development and help uncover diagnostic and therapeutic targets for neurodevelopmental disorders.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – O.S. Godovalova, A.E. Proshchina, S.V. Savelyev.

Collected the data and performed the analysis – A.S. Kharlamova, O.S. Godovalova.

Wrote the paper – O.S. Godovalova.

Edited the manuscript – Yu.S. Krivova, A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – О.С. Годовалова, А.Е. Прошина, С.В. Савельев.

Сбор и обработка материала – А.С. Харламова, О.С. Годовалова.

Написание текста – О.С. Годовалова.

Редактирование – Ю.С. Кривова, А.Е. Прошина, А.И. Харламова.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References/Литература

1. Godovalova O, Proshchina A, Kharlamova A, Barabanov V, Krivova Y, Junemann O et al. Heterogeneity in the formation of primary and secondary visual fields during human prenatal

development. *Biol Res.* 2024;57(1):93. DOI: 10.1186/s40659-024-00576-0.

2. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1997;387(2):167–78. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19971020)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z.
3. Kim JY, Paredes MF. Implications of extended inhibitory neuron development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10):5113. DOI: 10.3390/ijms22105113.
4. Amunts K, Malikovic A, Mohlberg H, Schormann T, Zilles K. Brodmann's areas 17 and 18 brought into stereotaxic space – where and how variable? *Neuroimage.* 2000;11(1):66–84. DOI: 10.1006/nimg.1999.0516.
5. Lee SE, Lee Y, Lee GH. The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. *Arch Pharm Res.* 2019;42(12):1031–9. DOI: 10.1007/s12272-019-01196-z.
6. Fattorini G, Melone M, Conti F. A reappraisal of GAT-1 localization in neocortex. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:9. DOI: 10.3389/fncel.2020.00009.
7. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ et al. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1637–47. DOI: 10.1007/s12035-015-9122-5.
8. Gilbert-Barnes E, Spicer DE, Steffensen TS. Handbook of pediatric autopsy pathology. New York: Springer New York, 2014. 750 p. DOI: 10.1007/978-1-4614-6711-3.
9. Proshchina A, Kharlamova A, Krivova Y, Godovalova O, Otyga D, Gulimova V et al. Neuromorphological atlas of human prenatal brain development: white paper. *Life (Basel).* 2023;13(5):1182. DOI: 10.3390/life13051182.
10. Proshchina AE, Kharlamova AS, Krivova YS, Savelyev SV. Modern trends in brain mapping and atlas. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):15–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.15-23.
11. Hachiya Y, Takashima S. Development of GABAergic neurons and their transporter in human temporal cortex. *Pediatr Neurol.* 2001;25(5):390–6. DOI: 10.1016/s0887-8994(01)00348-4.
12. Pinto JG, Hornby KR, Jones DG, Murphy KM. Developmental changes in GABAergic mechanisms in human visual cortex across the lifespan. *Front Cell Neurosci.* 2010;4:16. DOI: 10.3389/fncel.2010.00016.
13. Murphy KM, Beston BR, Boley PM, Jones DG. Development of human visual cortex: a balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Dev Psychobiol.* 2005;46(3):209–21. DOI: 10.1002/dev.20053.
14. Wong PT, McGeer EG. Postnatal changes of GABAergic and glutamatergic parameters. *Dev Brain Res.* 1981;227(4):519–29. DOI: 10.1016/0165-3806(81)90005-5.
15. Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(12):500–5. DOI: 10.1016/s0165-6147(98)01270-x.
16. Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF et al. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat.* 2019;235(3):432–51. DOI: 10.1111/joa.13055.
17. Yuste R, Cossart R, Yaksi E. Neuronal ensembles: building blocks of neural circuits. *Neuron.* 2024;112(6):875–92. DOI: 10.1016/j.neuron.2023.12.008.

18. Rakic P. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* 1995;18(9):383–8. DOI: 10.1016/0166-2236(95)93934-p.
19. Kiser PJ, Cooper NG, Mower GD. Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during post-natal development of rat somatosensory barrel cortex. *J Comp Neurol.* 1998;7;402(1):62–74. PMID: 9831046.
20. Trepel C, Duffy KR, Pegado VD, Murphy KM. Patchy distribution of NMDAR1 subunit immunoreactivity in developing visual cortex. *J Neurosci.* 1998;18(9):3404–15. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-09-03404.1998.
21. Modol L, Bollmann Y, Tressard T, Baude A, Che A, Duan ZRS et al. Assemblies of perisomatic GABAergic neurons in the developing barrel cortex. *Neuron.* 2020;105(1):93–105.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.10.007.

Author information

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

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

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

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

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

Информация об авторах

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

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

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

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

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

Применение программы ImageJ для картирования химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе

С.В. Буравков^{1,2}

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. Картирование химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе дает возможность получить информацию о химическом составе в каждой точке изображения, однако программное обеспечение электронных микроскопов не позволяет детально анализировать карты распределения химических элементов.

Целью исследования являлась разработка алгоритмов применения программы ImageJ для анализа карт распределения химических элементов шлифов бедренной кости крысы, полученных с помощью энергодисперсионного микроанализа на сканирующем электронном микроскопе.

Материалы и методы. Работа выполнена на бедренных костях крыс Вистар, фиксированных в 10% формалине и обезвоженных в спиртах возрастающей концентрации. Эпидиофизарные области монтировали на углеродной ленте и заливали цианометакрилатным клеем, после чего шлифовали анализируемую поверхность. Для построения калибровочной кривой внешние стандарты не использовались. Программное обеспечение микроскопа JSM-7000 позволяет определять процентное содержание элемента по прямоугольной площади изображения на карте распределения (среднее). Это же изображение использовалось в ImageJ для определения его средней яркости (уровня серого). Таким образом, набрав определенное количество изображений с разными концентрациями кальция и фосфора, строили калибровочную кривую, где определенной концентрации элемента соответствовала яркость. В этом случае концентрация элементов может варьироваться от 0 до 100 процентов, а яркость от 0 до 255 градаций (в случае 8-битного изображения).

Результаты. Показано, что, используя калибровочную кривую, можно преобразовать карту распределения элементов из интенсивности яркости в концентрацию и, применяя пакет анализа изображений ImageJ, автоматизировать измерения, а также получить данные по колокализации нескольких химических элементов и их корреляции.

Заключение. Реализация алгоритмов, описанных в данной статье с применением программы ImageJ при картировании химических элементов методом рентгеновского микроанализа на шлифах костной ткани, значительно расширяет возможности программного обеспечения сканирующего электронного микроскопа и позволяет получить дополнительную информацию.

Ключевые слова: программное обеспечение ImageJ, рентгеновский микроанализ, картирование химических элементов, сканирующая электронная микроскопия, бедренные кости крыс

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

Для цитирования: Буравков С.В. Применение программы ImageJ для картирования химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):78–84. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.78-84.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Статья поступила 14.04.2025. Получена после рецензирования 17.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

ImageJ software for elemental mapping using X-ray microanalysis on a scanning electron microscope

S.V. Buravkov^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Elemental mapping with X-ray microanalysis on a scanning electron microscope gives the information about the chemical composition at each point in the image, but the software of electron

microscopes does not provide detailed analysis of the elemental maps. The study aimed to develop algorithms applying the ImageJ freeware program to analyze X-ray maps of rat femur sections obtained using energy-dispersive microanalysis on a JCM-7000 scanning electron microscope (Japan).

Materials and methods. The research was performed on femurs of Wistar rats, fixed in 10% formalin and dehydrated in a graded series of alcohols. The epidiaphyseal bone regions were mounted on carbon tape and embedded in cyanomethacrylate glue; having been polymerized, the samples were polished and analyzed. No external standards were used for calibration curve construction. The microscope software enabled determination of the average elemental percentage within a rectangular area of the image on the distribution map. The same image was processed in ImageJ to determine average brightness (gray level). Thus, having collected a certain number of images with different calcium and phosphorus concentrations, I constructed a calibration curve, where a certain elemental concentration corresponded to a specific brightness value. Elemental concentrations ranged from 0 to 100%, while brightness values ranged from 0 to 255 grayscale units (in 8-bit images).

Results. Application of the calibration curve allows to convert the element distribution map from brightness intensities to concentrations levels. Using the ImageJ software package, this approach allows automation of measurements and provides data on the colocalization and correlation of several chemical elements.

Conclusion. The algorithms described here can be effectively applied in ImageJ for elemental mapping in bone tissue sections using X-ray microanalysis. This approach significantly expands the functionality of scanning electron microscope software and provides additional essential information.

Keywords: ImageJ software, X-ray elemental mapping, electron probe microanalysis, scanning electron microscopy, rat femur

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

For citation: Buravkov S.V. ImageJ software for elemental mapping using X-ray microanalysis on a scanning electron microscope. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):78–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM 2025.14.5.78-84.

Funding. The study was conducted under the State Assignment of Lomonosov Moscow State University.

Received 14.04.2025. **Received in revised form** 17.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

Рентгеновский микроанализ – это метод аналитической электронной микроскопии, который осуществляется с помощью электронного микроскопа. Он основан на генерации характеристических рентгеновских лучей в атомах образца при взаимодействии с падающими электронами пучка. В результате такого взаимодействия генерируются рентгеновские лучи, являющиеся характеристическими, то есть содержащими информацию о том, какие элементы присутствуют в данном образце. Существует множество электронных оболочек и подоболочек, каждая из которых обладает своей определенной энергией, поэтому имеется множество потенциально возможных переходов электронов. Если электрон срывается с К-оболочки, результирующий рентгеновский пик называется К-линией в спектре; если с L-оболочки, то L-линией, и так далее. Кроме того, падающие электроны генерируют фоновые или сплошные рентгеновские лучи. Эти рентгеновские лучи являются тормозными, возникающими из-за взаимодействия падающих первичных электронов с ядром атома.

Как и у любого другого метода, у рентгеновского микроанализа существует минимальный детектируемый порог, определяемый интенсивностью падающих электронов и чувствительностью детектора. Самая низкая концентрация элемента, которую можно

обнаружить, составляет порядка нескольких миллимолей на килограмм или несколько сотен частей на миллион, а наименьшее количество элемента – 10–18 г. Пространственное разрешение анализа зависит от толщины образца. Наилучший результат достигается в тонких срезах, где, как правило, диаметр анализируемого объема равен примерно половине толщины среза. При анализе объемных образцов в сканирующем электронном микроскопе пространственное разрешение и минимальная детектируемая концентрация химического элемента зависят от ускоряющего напряжения и состава образца. Типичное значение для анализа лиофилизированного биологического материала при ускоряющем напряжении 20 кВ – приблизительно 10 мкм [1].

Скорость и точность анализа с использованием энергодисперсионной спектроскопии в сканирующем электронном микроскопе значительно повысились за последние 10 лет благодаря увеличению отношения сигнал/шум за счет улучшения сбора и обработки сигналов.

Энергодисперсионная спектроскопия может проводиться в трех режимах: анализ химических элементов в точке, распределение элементов по линии и, наконец, анализ распределения по площади, или картирование. Последний режим наиболее интересен, поскольку в каждой точке имеется полный спектр, то есть все

присутствующие элементы. Тем не менее программное обеспечение электронных микроскопов не позволяет детально анализировать карты распределения химических элементов.

В настоящее время при анализе различных изображений применяются многочисленные пакеты, в том числе свободно распространяемые. К последним относится и широко используемая научными сотрудниками программа для анализа изображений ImageJ (NIH, США), написанная на языке Java, благодаря чему она является кроссплатформенной, то есть может быть задействована в среде разных операционных систем. Благодаря свободному распространению программы многие пользователи написали к ней различные макросы и плагины, значительно расширяющие ее возможности. Изначально программа была разработана W. Rasband в 1987 году для пользователей Macintosh и называлась NIH Image [2], в 1997 году она была переделана под Java и названа ImageJ [3].

В связи с этим целью исследования являлась разработка алгоритмов применения программы ImageJ для анализа карт распределения химических элементов в шлифах бедренной кости крысы, полученных с помощью энергодисперсионного микроанализа на сканирующем электронном микроскопе JCM-7000 (JEOL, Япония).

Материалы и методы

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. При проведении исследований автор руководствовался положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 515 от 10.06.2019).

Животных под изофлурановым наркозом декапировали, извлекали бедренную кость и фиксировали в 10% формалине. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации ее высушивали на воздухе при комнатной температуре. Эпифизарно-диафизарную часть кости монтировали на углеродную ленту с помощью цианометакрилатного клея, после чего шлифовали серией абразивной наждачной бумаги (марки 3М до P2500 с размером зерна 3–5 мкм) в продольном направлении до срединной части, используя микропылесос для удаления мелких остатков. Как показало проведение предварительного микроанализа, цианометакрилатный клей не вносит дополнительных химических элементов, кроме углерода и азота. Для снятия электростатического заряда использовали незначительное напыление золотом, которое не детектировалось при анализе.

Подготовленные таким образом образцы (рис. 1 А) анализировали в настольном сканирующем электрон-

ном микроскопе JCM-7000, оснащенном энергодисперсионным спектрометром, при ускоряющем напряжении 15 кВ. Карты распределения химических элементов (углерод, кальций, фосфор, сера) регистрировали при накоплении 20 кадров и разрешении 512×384 точек (8 или 16 бит на точку). Количественный анализ проводили без применения стандартов с использованием ZAF-коррекции, встроенной в программное обеспечение микроскопа.

Для построения калибровочной кривой внешние стандарты не использовались. Программное обеспечение микроскопа позволяет определять процентное содержание элемента по прямоугольной площади изображения на карте распределения (среднее). Это же изображение использовалось в ImageJ для определения его яркости. Таким образом можно было набрать определенное количество изображений с разными концентрациями кальция и фосфора и построить калибровочную кривую, где определенной концентрации элемента будет соответствовать яркость. В этом случае концентрация элементов может варьировать от 0 до 100%, а яркость – от 0 до 255 градаций (в случае 8-битного изображения).

Статистический анализ и анализ колокализации кальция и фосфора проводили встроенными в программу ImageJ средствами. Для вычисления коэффициентов линейной регрессии использовали Excel (Microsoft, США).

Результаты

Сбор и обработка результатов картирования химических элементов на сканирующем электронном микроскопе JCM-7000 осуществляются с использованием программы SMILE VIEW™ Lab (JEOL, Япония), однако ее возможности в анализе карт сильно ограничены. Представление результатов концентрации элементов производится с 8-битной (256 градаций) или 16-битной (65 536 градаций) шкалой яркости.

В настоящее время программа ImageJ и ее клон FIJI являются самой распространенной свободной программой для анализа изображений, имеющей более 31 тысячи публикаций в PubMed.

В данной работе использовались 8-битные карты распределения кальция и фосфора, полученные на шлифах эпифизарно-диафизарных частей бедренных костей крыс. На рисунке 1 В показано, что концентрация кальция значительно различается в разных участках кости, и это отражается по разной интенсивности яркости на изображении. С помощью макросов можно сегментировать определенные зоны для получения количественных данных по содержанию кальция в этих областях (рис. 1 С). Эти макросы включают в себя сегментирование по уровню яркости, подсчет частиц с ограничением по площади и расчет концентрации в соответствии с полученной калибровкой. Необходимо отметить, что калибровочные кривые должны соответствовать битности изображений: 8-битные калибровки

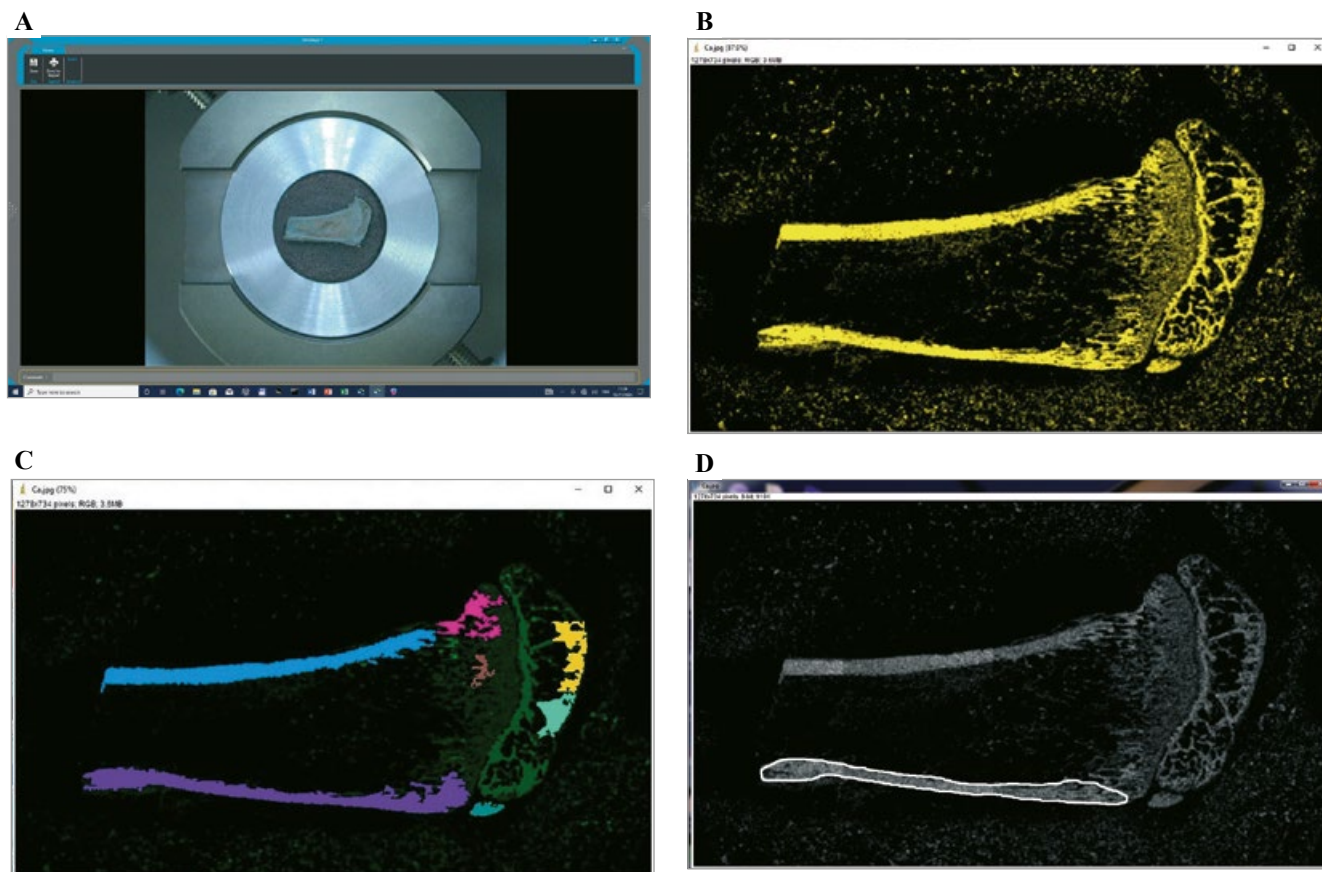


Рис. 1. Картирование кальция в шлифах бедренной кости крыс.

А – общий вид смонтированной кости на предметном столике в микроскопе, В – количественное распределение кальция в процентах, выводимое на микроскопе, С – сегментирование распределения кальция в программе ImageJ для выделения и расчета концентраций кальция в определенных областях кости, D – ручное выделение необходимой области.

Длина маркерной линии – 5 мм (А) и 1 мм (В)

Fig. 1. Calcium mapping in rat femur polished surface.

А – general view of the mounted bone on the microscope stage, В – quantitative calcium distribution (in percents) displayed on the microscope, С – segmentation of calcium distribution map in the ImageJ program to define and calculate calcium concentrations in certain bone areas, D – manual selection of the required area. Scale line – 5 mm (А) and 1 mm (В)

должны использоваться для 8-битных изображений, а 16-битные – для 16-битных изображений. Для сегментирования кальциевых карт распределения использована следующая последовательность операций:

File→Open→Image→Adjust→Color
Threshold→Brightness→Analyze→
Analyze→Particles→(size pixel, show (overlay
masks)→Results→Edit→Apply Macro (ConcCa.txt)

Результаты, полученные в единицах яркости, в конце преобразовывались коротким макросом в концентрацию:

ConcCa.txt

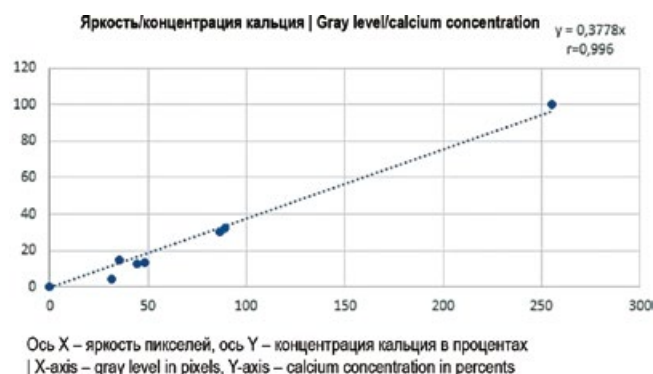
```
Conc=0.38*Mean(row*0.1);
StdDevConc=0.38*StdDev(row*0.1);
MinConc=0.38*Min;
MaxConc=0.38*Max;
```

После сегментирования изображения и выполнения макроса при заданных параметрах выделяются семь областей (рис. 1 С). Интересующую зону можно выделять и вручную, как это представлено на рисунке 1 D, однако сделать это труднее, особенно если она имеет сложную конфигурацию.

На рисунке 2 А представлена калибровочная кривая для 8-битного варианта, где показана зависимость значения яркости от процентной концентрации кальция. Можно видеть линейную зависимость ($r=0,996$) вида $y = 0,3778 \times x$, где y – концентрация кальция в процентах, а x – уровень яркости, соответствующий этой концентрации. Таким образом, простым перерасчетом можно переходить от яркости на концентрацию (рис. 2 В). Сравнивая результаты ручного и автоматического выделения, можно видеть, что показатели очень близки (рис. 2 С).

Использование плагина колокализации (Colocalization Finder) дает возможность получить данные о

А



В

Results								
	Mean	StdDev	Min	Max	Conc	StdDevConc	MinConc	MaxConc
1	69.261	20.424	41	149	26.319	7.761	15.580	56.620
2	71.119	17.462	41	135	27.025	6.636	15.580	51.300
3	69.958	17.309	41	125	26.584	6.577	15.580	47.500
4	86.808	21.640	41	165	32.987	8.223	15.580	62.700
5	58.780	10.868	43	103	22.337	4.130	16.340	39.140
6	71.415	17.994	41	130	27.138	6.838	15.580	49.400
7	82.954	22.335	41	162	31.523	8.487	15.580	61.560
8	67.506	12.136	42	100	25.652	4.612	15.960	38.000

С

Results								
	Mean	StdDev	Min	Max	Conc	StdDevConc	MinConc	MaxConc
1	83.660	25.666	0	162	31.791	9.753	0	61.560

Рис. 2. Преобразование уровней яркости в концентрации кальция с использованием программы ImageJ.

А – калибровочная кривая, построенная на областях с известными концентрациями кальция, В – результаты преобразования уровней яркости в концентрации в областях, выделенных с помощью программы ImageJ на рис. 1 С, С – результаты ручного выделения области 7

Fig. 2. Transformation of gray levels into calcium concentrations using the ImageJ software.

А – calibration curve constructed on the areas with known calcium concentrations, В – results of transforming brightness levels into concentrations in the areas selected using the Image J software in Fig. 1C, С – results of manual selection of area 7

взаимной локализации двух химических элементов. Так, например, на рисунках 3 А и В представлены карты распределения фосфора и кальция в шлифе бедренной кости крыс. Композитное изображение распределения фосфора и кальция свидетельствует о высокой степени наложения обоих химических элементов (рис. 3 С), что наглядно видно на графике рассеяния (рис. 3 D). Можно отметить, что точки группируются вдоль оси под углом 45°, и это свидетельствует о высокой степени наложения обоих химических элементов. Количественные данные (рис. 3 Е) также указывают на прямую связь между распределением фосфора и кальция (коэффициент Пирсона равен 0,929).

Все карты в рентгеновской энергетической спектроскопии регистрируются одновременно точка за точкой, поэтому они являются инцидентными и представлены двумерной матрицей концентрации. Это дает возможность проводить корреляционные исследования распределения различных химических элементов. Одна из ранних работ по обработке изображений в рентгеновском микроанализе появилась в 1989 году [4]. Первые коммерческие анализаторы изображений (IBAS, Kontron, ФРГ) позволили расширить аналитические возможности рентгеновского микроанализа в электронной микроскопии, однако элементные карты регистрировались на фотопленке, что требовало совмещения их при вводе в компьютер

через телекамеру. Кроме того, они представляли собой только качественные бинарные изображения, где плотность расположения точек соответствовала большей или меньшей концентрации.

В настоящем исследовании были использованы количественные карты распределения химических элементов, полученные на микроскопе JEOL, JCM-700, оснащенный рентгеновским спектрометром. Программное обеспечение ImageJ позволило реализовать алгоритмы сегментирования изображений для выделения и измерения интересующих областей, а также провести оценку колокализации и корреляции двух карт распределения между собой. Кроме того, использование сторонних программ для обработки карт дает возможность разнести сбор данных и их обработку. Такой же подход был реализован А. LeFurgey et al. [5] в 1991 году. Это дает возможность исследовать микрохимический состав клеток в сфере клеточной физиологии с прицелом на ионную (элементную) компартментализацию, то есть морфофункциональную корреляцию структуры и функции на клеточном и субклеточном уровне.

Схожий с нашим подход был применен К. V. Dahl et al. [6] в 2007 году для построения количественных профилей химических элементов. Авторы использовали данные, полученные из калибровочной кривой для преобразования яркости на элементных картах в концентрацию.

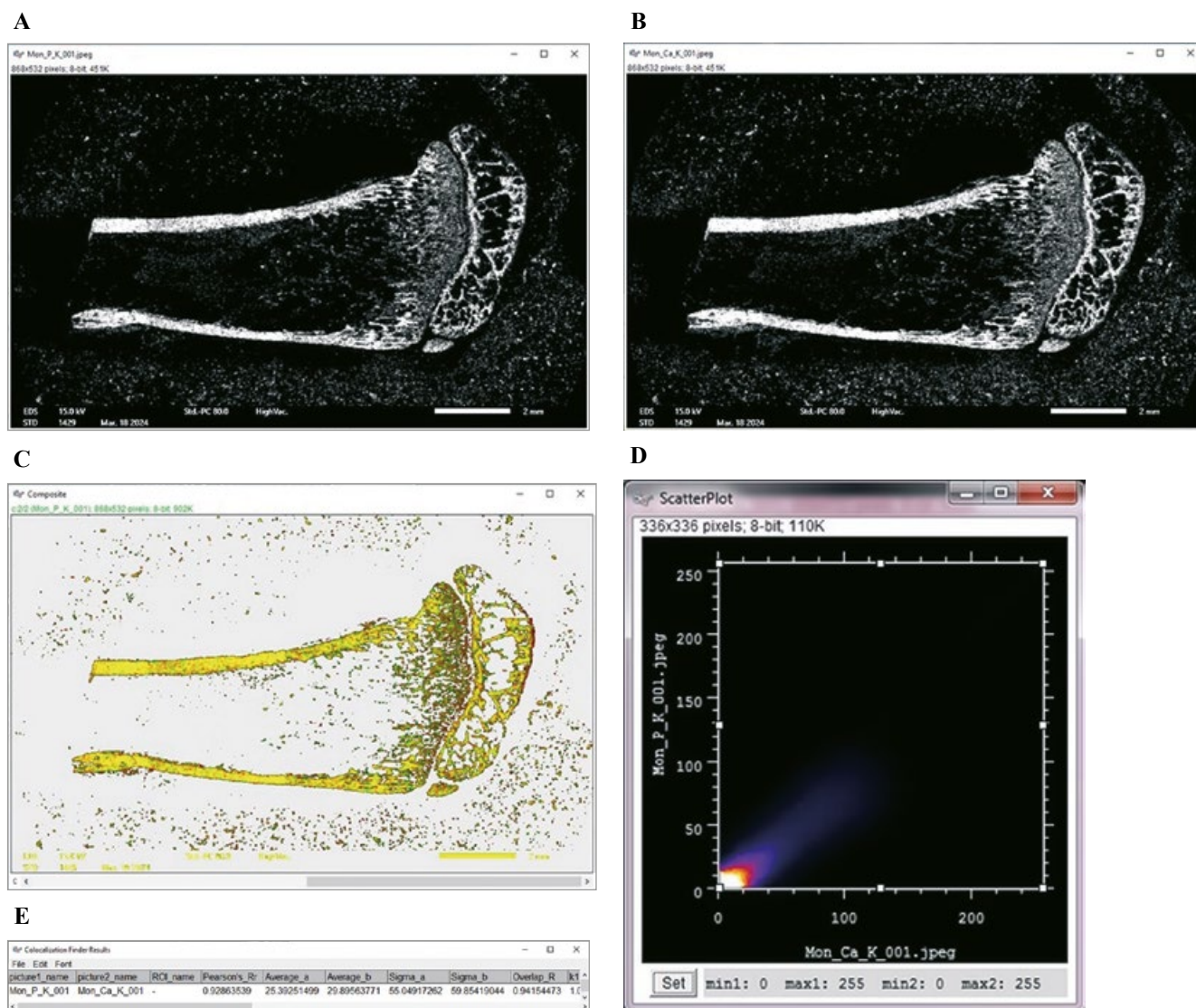


Рис. 3. Колокализация распределения фосфора и кальция в шлифах бедренной кости крыс.

А – карта распределения фосфора, В – карта распределения кальция, С – совместные места распределения фосфора и кальция на карте (совместные места присутствия фосфора и кальция представлены желтым цветом), Д – диаграмма рассеяния колокализации фосфора и кальция, Е – количественные данные критерия Пирсона для колокализации фосфора и кальция. Длина маркерной линии – 2 мм

Fig. 3. Colocalization of phosphorus and calcium distribution in rat femur sections.

А – phosphorus distribution map, В – calcium distribution map, С – joint locations of phosphorus and calcium on the map (joint locations of phosphorus and calcium presence are shown in yellow), Д – scatter plot of phosphorus and calcium colocalization, Е – quantitative data of Pearson's test for phosphorus and calcium colocalization. Scale line – 2 mm

Закключение

Реализация алгоритмов, описанных в статье, при картировании химических элементов методом рентгеновского микроанализа на шлифах костной ткани значительно расширяет возможности программного обеспечения сканирующего электронного микроскопа. Сегментирование рентгеновских изображений элементных карт при этом может быть проведено как в ручном, так и в автоматическом режиме, что делает измерение концентрации в изучаемых областях более точным и быстрым. Больше возможностей при использовании свободного программного обеспечения ImageJ открывается и при корреляционном

анализе распределения двух и более химических элементов, а также при анализе их колокализации.

Предлагаемые алгоритмы могут быть использованы для картирования химических элементов не только на шлифах костной ткани, но и на гистологических срезах, подготовленных криогенными методами для сохранения нативного содержания и распределения химических элементов и ионов.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

Литература/References

1. Roomans GM, Dragomir A. X-ray microanalysis in the scanning electron microscope. *Methods Mol Biol.* 2014;1117:639–61. DOI: 10.1007/978-1-62703-776-1_28.
2. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
3. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Georges Uzan G et al. Angiogenesis analyzer for ImageJ – a comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci Rep.* 2020;10(1):11568. DOI: 10.1038/s41598-020-67289-8.
4. Буравков С.В. Цифровая обработка изображений в рентгеновском микроанализе. *Цитология.* 1989;31(10):1251–1255. Buravkov SV. Digital image processing in X-ray microanalysis. *Tsitologiya = Cytology.* 1989;31(10):1251–1255.
5. LeFurgey A, Davilla SD, Kopf DA, Sommer JR, Ingram P. Real-time quantitative elemental analysis and mapping: microchemical imaging in cell physiology. *J Microsc.* 1992;165(Pt 2):191–223. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1992.tb01481.x.
6. Dahl KV, Hald J, Horseywell A. Grey-scale conversion X-ray mapping by EDS of multielement and multiphase layered microstructures. *J Microsc.* 2007;225(Pt 1):31–40. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01713.x.

Информация об авторе

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.

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>