КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 15 | № 5 | 2026

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;
ЕГПНИ – «Белый список»;
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

Регистрационный номер СМИ:
ПИ № ФС77-83521
от 24 июня 2022 года

© ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»

Главный редактор
Михалева Л.М., член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

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

Заместитель главного редактора
Зайратьянц О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Ответственный секретарь
Прощина 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

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

Мидибер К.Ю., кандидат мед. наук, Москва, Россия

Мхитаров В.А., кандидат биол. 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

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

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

Коршунов 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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.
Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

Материалы журнала распространяются на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). Авторы сохраняют за собой авторские права. Воспроизведение материалов в коммерческих целях допускается только с разрешения журнала «Клиническая и экспериментальная морфология».

CLININICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume **15** | No **5** | 2026

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); Unified State List of Academic Publications – "Whitelist" (USLAP – "Whitelist"); Russian Index of Science Citation (RISC); and eLIBRARY.ru database

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

Journal founder
FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery"
Abrikosovsky 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

Registration number:
ПИ № ФС77-83521
dated June 24, 2022

© 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

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

Midiber, Konstantin Yu., Cand. Sci. Med., 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

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

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, Gulrukhsor Kh., Dr. Sci. Med., Saint Petersburg, Russia

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

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.

The journal materials are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License. The Authors retain copyright. Commercial use of the materials is allowed only with the permission of the "Clinical and Experimental Morphology" journal.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ
REVIEWS

А.В. Асатурова, А.В. Трегубова, А.В. Тимофеева, И.С. Федоров, А.С. Рогожина, А.С. Бадлаева, М.Д. Барков
Морфологические и молекулярные основы химиорезистентности серозной карциномы яичника высокой степени злокачественности
5

A.V. Asaturova, A.V. Tregubova, A.V. Timofeeva, I.S. Fedorov, A.S. Rogozhina, A.S. Badlaeva, M.D. Barkov
Morphological and molecular basis of chemoresistance in high-grade serous ovarian carcinoma

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ORIGINAL RESEARCH

Б.О. Щеглов, С.В. Иченко, И.В. Рева, А.С. Золотов, Ю.А. Красников, С.Н. Щеглова, А.Р. Ким, Ю.И. Гайнуллина, Г.В. Рева
Морфофункциональные особенности иммунного микроокружения слизистой оболочки ротоглотки при ВПЧ-ассоциированных, ВПЧ-неассоциированных и рецидивирующих папилломах
18

B.O. Shcheglov, S.V. Ichenko, I.V. Reva, A.S. Zolotov, Yu.A. Krasnikov, S.N. Shcheglova, A.R. Kim, Yu.I Gaynullina, G.V. Reva
Morphofunctional features of immune microenvironment of the oropharyngeal mucosa in HPV-associated, HPV-non-associated, and recurrent papillomas

И.А. Яковлев, И. Сорочану, А.М. Емелин, Н.С. Гладышев, И.С. Лимаев, Д.В. Вдовина, Ю.А. Ветрова, А.А. Исаев, Р.В. Деев
Гистоморфометрическое исследование мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J при системной терапии посредством ААВ9.ДИСФ.ДВ
30

I.A. Yakovlev, I. Sorochanu, A.M. Emelin, N.S. Gladyshev, I.S. Limaev, D.V. Vdovina, Iu.A. Vetrova, A.A. Isaev, R.V. Deev
Histomorphometric analysis of muscle tissue in dysferlin-deficient Bla/J mice following systemic AAV9.DYSF.DV therapy

S.A. Sagdullaeva, A.D. Koniaeva, E.Yu. Varakuta, E.N. Bolbasov, U.V. Chernova, O.V. Kukartseva
Morphological characteristics of the microcirculatory network in regenerating purulent wounds with piezoelectric polymer smart membranes
45

С.А. Сагдуллаева, А.Д. Коняева, Е.Ю. Варакута, Е.Н. Больбасов, У.В. Чернова, О.В. Кукарцева
Морфологическая характеристика микроциркуляторного русла при регенерации гнойной раны с использованием антибактериальных пьезоэлектрических полимерных смарт-мембран

Н.О. Белов, А.Л. Потапов, А.С. Курьянова, С.Г. Раденска-Лоповок, Т.С. Демина, Д.А. Погосян, Ю.М. Ефремов, Е.Б. Калинский, П.С. Тимашев, А.В. Лычагин
Экспериментальное исследование имплантатов для хондропластики на основе поликапролактона и многокомпонентной сополимерной системы
56
N.O. Belov, A.L. Potapov, A.S. Kuryanova, S.G. Radenska-Lopovok, T.S. Demina, D.A. Pogosyan, Yu.M. Efremov, E.B. Kalinsky, P.S. Timashev, A.V. Lychagin
Experimental study of chondroplasty scaffolds based on polycaprolactone and a multicomponent copolymer system

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ
CASE STUDIES

И.В. Баринова, М.Ю. Шахина, Л.В. Кактурский, К.В. Агапова, И.А. Сергеева, А.В. Пырегов, Р.Г. Шмаков
Перипартальная кардиомиопатия с некомпактным миокардом правого желудочка: описание наблюдения и обзор литературы
67
I.V. Barinova, M.Yu. Shakhina, L.V. Kakturskiy, K.V. Agapova, I.A. Sergeeva, A.V. Pyregov, R.G. Shmakov
Peripartum cardiomyopathy with right ventricular non-compact myocardium: a case report and literature review

Л.М. Михалева, А.К. Цуцаев, З.В. Гиоева, Н.К. Шахпазян, Н.П. Чижиков, А.А. Ефхиев, А.К. Конюкова, В.В. Печникова
Феномен SARIFA как дополнительный предиктор агрессивного течения колоректального рака
77
L.M. Mikhaleva, A.K. Tsutsaev, Z.V. Gioeva, N.K. Shakhpazyan, N.P. Chizhikov, A.A. Ephiev, A.K. Konyukova, V.V. Pechnikova
SARIFA as an additional predictor of aggressive colorectal cancer

МЕТОДЫ
TECHNICAL NOTES

Н.И. Сафонова, Д.М. Долматова, В.С. Фадеев, Г.М. Алипер, Ю.Ю. Силаева, Ю.П. Байкова
Оптимизация пробоподготовки гистологических образцов тканей *Danio rerio* с применением изопропанола и минерального масла
83
N.I. Safonova, D.M. Dolmatova, V.S. Fadeev, G.M. Aliper, Yu.U. Silaeva, Iu.P. Baikova
Optimization of sample preparation protocol for histological analysis of *Danio rerio* tissues using isopropanol and mineral oil

© Коллектив авторов, 2026
DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.5-17 УДК: 616.091

Морфологические и молекулярные основы химиорезистентности серозной карциномы яичника высокой степени злокачественности

А.В. Асатурова[1,2], А.В. Трегубова[1], А.В. Тимофеева[1], И.С. Федоров[1], А.С. Рогожина[1], А.С. Бадлаева[1,2], М.Д. Барков[3]

[1] ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
[3] ГУЗ Тульская городская клиническая больница скорой медицинской помощи имени Д.Я. Ваныкина, Тула, Россия

Резюме. Серозная карцинома яичника высокой степени злокачественности (high-grade serous ovarian carcinoma, HGSOC) – наиболее агрессивный и распространенный гистотип эпителиального рака яичников, который характеризуется высокой частотой рецидивов, связанных с развитием первичной или приобретенной химиорезистентности. Выделяют четыре основных подтипа HGSOC – дифференцированный, иммунореактивный, мезенхимальный и пролиферативный, различающиеся морфологическими, транскриптомными и биологическими особенностями. Целями данного обзора явля. тся анализ морфологических и молекулярных механизмов химиорезистентности при различных молекулярных подтипах HGSOC, а также оценка их диагностического и прогностического значения. В обзоре рассмотрены современные представления о роли нарушений репарации ДНК, дефицита гомологичной рекомбинации, опухолевого микроокружения, эпителиально-мезенхимального перехода, эпигенетических изменений и опухолевых стволовых клеток в формировании устойчивости к платиносодержащей терапии.

Интеграция морфологических, иммуногистохимических и молекулярных данных очень важна для более точной стратификации пациенток, прогнозирования ответа на лечение и разработки персонализированных терапевтических подходов. Использование цифровой патологии и методов искусственного интеллекта открывает дополнительные перспективы для оценки молекулярных подтипов HGSOC и выявления опухолей с высоким риском химиорезистентности.

Ключевые слова: серозная карцинома яичника высокой степени злокачественности, HGSOC, химиорезистентность, молекулярные подтипы, опухолевое микроокружение, платинорезистентность, цифровая патология

Для корреспонденции: Александра Вячеславовна Асатурова. E-mail: a.asaturova@gmail.com

Для цитирования: Асатурова А.В., Трегубова, А.В., Тимофеева А.В., Федоров И.С., Рогожина А.С., Бадлаева А.С., Барков М.Д. Морфологические и молекулярные основы химиорезистентности серозной карциномы яичника высокой степени злокачественности. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):5–17. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.5-17.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по теме № 126020516655-1 («Разработка диагностико-терапевтического комплекса по выявлению химиорезистентных серозных карцином яичников с возможностью сенсибилизации клеток опухоли к действию химиотерапевтических схем лечения»).

Статья поступила 15.07.2026. **Получена после рецензирования** 26.08.2026. **Принята в печать** 05.10.2026.

Morphological and molecular basis of chemoresistance in high-grade serous ovarian carcinoma

A.V. Asaturova[1,2], A.V. Tregubova[1], A.V. Timofeeva[1], I.S. Fedorov[1], A.S. Rogozhina[1], A.S. Badlaeva[1,2], M.D. Barkov[3]

[1] V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia
[2] Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia
[3] D.Ya. Vanykin Tula City Clinical Emergency Hospital, Tula, Russia

Abstract. High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) is the most aggressive and the commonest histological subtype of epithelial ovarian cancer and is characterized by a high recurrence rate associated with

the development of primary or acquired chemoresistance. Modern molecular classifications have identified four major HGSOC subtypes. This review aimed to analyze the morphological and molecular mechanisms underlying chemoresistance in different molecular subtypes and to evaluate their diagnostic and prognostic significance.

HGSOC molecular subtypes demonstrated distinct morphological patterns, including differences in tumor architecture, stromal desmoplasia, lymphoid infiltration, mitotic activity, and genomic instability.

The integration of morphological, immunohistochemical, and molecular data is essential for improving patient stratification, predicting therapeutic response, and developing personalized treatment strategies. Employing digital pathology and artificial intelligence provides additional opportunities for identifying molecular HGSOC subtypes and detecting tumors with a high risk of chemoresistance.

Keywords: high-grade serous ovarian carcinoma, HGSOC, chemoresistance, molecular subtypes, tumor microenvironment, platinum resistance, digital pathology

Corresponding author: Aleksandra V. Asaturova. E-mail: a.asaturova@gmail.com

For citation: Asaturova A.V., Tregubova A.V., Timofeeva A.V., Fedorov I.S., Rogozhina A.S., Badlaeva A.S., Barkov M.D. Morphological and molecular basis of chemoresistance in high-grade serous ovarian carcinoma. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):5–17 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.5-17.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (project title: “Development of a diagnostic and therapeutic platform for the identification of chemoresistant serous ovarian carcinomas with the potential sensitization of tumor cells to chemotherapeutic treatment regimens”, state registration No. 126020516655-1).

Received 15.07.2026. **Received in revised form** 26.08.2026. **Accepted** 05.10.2026.

Введение

Серозная карцинома яичника высокой степени злокачественности (high grade serous ovarian cancer, HGSOC) – наиболее распространенный и агрессивный гистотип среди эпителиальных опухолей яичников, на долю которого приходится от 70 до 80% всех смертей от этого заболевания в мире [1]. Из-за бессимптомного течения на ранних этапах развития подавляющее большинство случаев (около 80%) диагностируется на поздних стадиях (FIGO III–IV), когда опухоль уже широко распространена по брюшной полости [2, 3]. Пятилетняя выживаемость при запущенных стадиях составляет менее 30–50% [3].

Золотым стандартом лечения HGSOC является проведение циторедуктивного хирургического вмешательства с последующей комбинированной химиотерапией на основе препаратов платины (цисплатин или карбоплатин) и таксанов [4]. Несмотря на высокую частоту первоначального ответа (около 80%), у большинства пациенток со временем возникает рецидив заболевания, обусловленный первичной или приобретенной химиорезистентностью [4, 5].

Клиническая классификация рецидивов основывается на бесплатиновом интервале – времени от последней дозы препарата до прогрессирования болезни. В соответствии с данной классификацией выделяют следующие HGSOC: platinum-sensitive (платиночувствительные) – рецидив возникает более чем через 6 месяцев после окончания лечения; platinum-resistant (платинорезистентные) – прогрессирование наступает в интервале от 1 до 6 месяцев; platinum-refractory (платинорефрактерные) – опухоль прогрессирует непосредственно на фоне терапии или в течение первого месяца (иногда до 3 месяцев) после ее завершения [4, 6].

Молекулярная гетерогенность и морфологическое разнообразие HGSOC характеризуются выраженной меж- и внутриопухолевой гетерогенностью, что предстает основным препятствием для эффективной стратификации пациенток [1, 7]. На генетическом уровне ключевыми особенностями данных новообразований являются почти повсеместная мутация гена *TP53* (>96%) и выраженная хромосомная нестабильность [8]. Морфологически это проявляется разнообразием паттернов роста: от классических папиллярных и микропапиллярных структур до солидных, псевдоэндометриоидных и транзиторно-клеточных вариантов (solid, pseudo-endometrioid, transitional-like, SET) [9].

Масштабные геномные исследования позволили выделить четыре основных молекулярных подтипа HGSOC, основанных на профилях экспрессии генов (Tothill, 2008): C1 (мезенхимальный/стромальный), C2 (иммунореактивный), C4 (дифференцированный) и C5 (пролиферативный) [10]. По данным проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA, 2011) было подтверждено наличие четырех аналогичных подтипов – мезенхимального, иммунореактивного, пролиферативного и дифференцированного. Мезенхимальный и пролиферативный подтипы обычно ассоциированы с худшим прогнозом и более высокой вероятностью развития резистентности [1].

Для повышения точности прогнозирования ответа на терапию необходима интеграция гистопатологических данных, молекулярного профиля и характеристик опухолевого микроокружения [10, 11]. Например, ме-

зенхимальный подтип характеризуется выраженной десмопластической реакцией стромы, что может физически ограничивать диффузию химиопрепаратов внутрь опухоли и способствовать выживанию опухолевых стволовых клеток.

Использование искусственного интеллекта и цифровой патологии открывает новые возможности для идентификации этих подтипов без дорогостоящего генетического тестирования [12].

Обзор направлен на систематический анализ морфологических и биологических особенностей различных молекулярных подтипов HGSOC, а также их взаимосвязи с первичной и приобретенной химиорезистентностью. Особое внимание в нем уделено роли опухолевого микроокружения и биомаркеров стволовых клеток (CD44, ALDH, CD133) в формировании устойчивости к платиносодержащим химиопрепаратам.

Молекулярные подтипы HGSOC: морфологические и биологические особенности

Молекулярные подтипы HGSOC характеризуются не только различиями транскриптомных профилей, но и специфическими морфологическими свойствами, отражающими особенности опухолевого микроокружения, степень геномной нестабильности и биологическое поведение опухоли. Интеграция морфологических и молекулярных характеристик позволяет более точно оценивать прогноз заболевания, вероятность формирования платинорезистентности и потенциальную чувствительность к таргетной терапии. Основные морфологические, молекулярные и клинико-биологические особенности различных подтипов HGSOC представлены на рисунке.

Дифференцированный подтип (differentiated subtype)

Дифференцированный подтип (обозначаемый как PG – papilloglandular, папиллогландулярный) выделяется классической архитектурой с формированием сосочковых, микропапиллярных и железистых структур [10]. Эпителий опухоли часто напоминает эпителий фаллопиевой трубы [9]. Также для данного подтипа характерна относительно мономорфная популяция опухолевых клеток: по сравнению с другими подтипами клетки могут демонстрировать меньшую вариабельность размеров ядер, хотя высокая степень атипии сохраняется. Количественный анализ показывает, что для этого подтипа свойственна более низкая плотность опухолевых ядер в ткани [1].

В отличие от мезенхимального подтипа при дифференцированном подтипе наблюдаются слабая десмопластическая реакция стромы и низкое содержание соединительнотканных компонентов [10]. Наряду с этим следует отметить сохранение эпителиальных черт опухолевой ткани: выражена иммуногистохимическая реакция с маркерами эпителиальной дифференцировки и специфическими опухолевыми антигенами, такими как MUC1, MUC16 (CA125), и секреторным белком фаллопиевых труб SLPI [10]. Также наблюдается выраженная иммуногистохимическая реакция с белком ESRP1, который поддерживает эпителиальный фенотип и препятствует переходу к мезенхимальному состоянию [13].

Биологические особенности дифференцированного подтипа выражаются в относительно низкой геномной нестабильности. Данный подтип отличается высокой геномной целостностью, низким уровнем плоидности (набора хромосом) и меньшим количеством субкло-

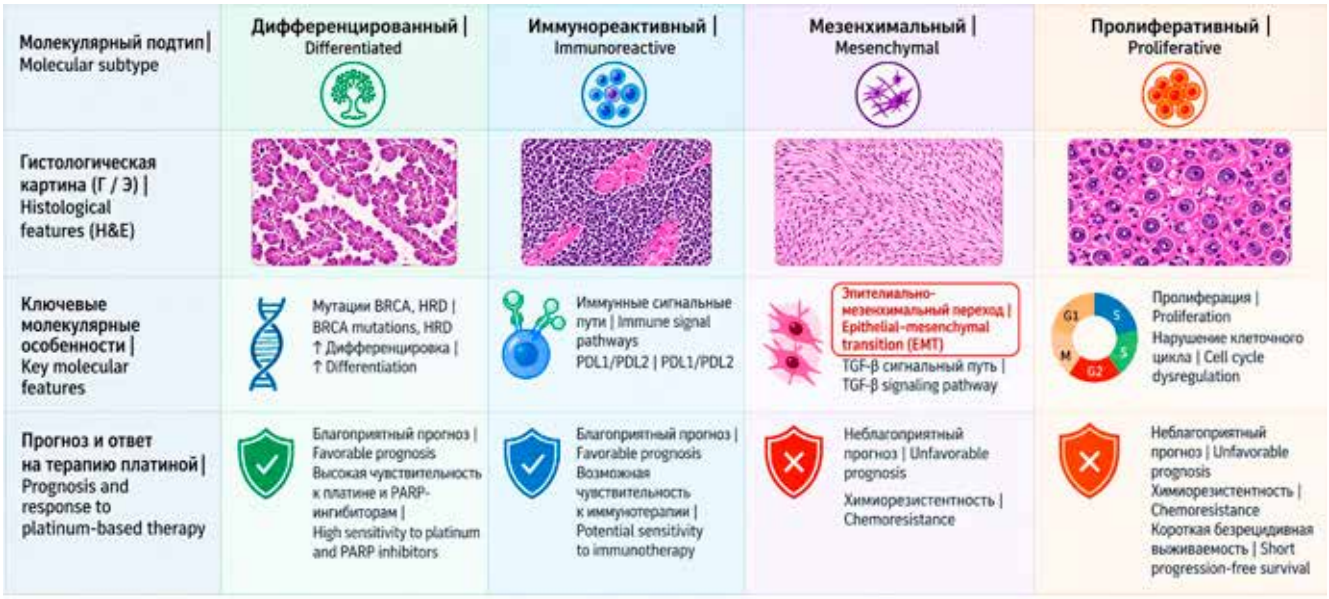


Рис. Морфологический и молекулярный ландшафт молекулярных подтипов серозной карциномы высокой степени злокачественности

Fig. Morphological and molecular landscape of molecular subtypes of high-grade serous ovarian carcinoma

нальных мутаций [7, 14]. Исследования на уровне отдельных клеток подтверждают, что этот подтип имеет значительно меньшую нестабильность числа копий генов по сравнению с пролиферативным подтипом [15]. Вероятно, в связи с этим для дифференцированного подтипа характерен более благоприятный ответ на химиотерапию. Пациентки с этим подтипом часто имеют лучший прогноз по сравнению с женщинами с мезенхимальным и пролиферативным подтипами [14]. Опухоли этого типа чаще диагностируются на более ранних стадиях (FIGO I–II) и характеризуются более высокой вероятностью достижения полной циторедукции (R0) [16].

К морфологическим признакам, связанным с чувствительностью к терапии для дифференцированного подтипа, можно отнести, во-первых, меньшую выраженность клеточного полиморфизма (хотя все HGSOC по определению являются опухолями высокой степени злокачественности, дифференцированный подтип демонстрирует менее хаотичное строение по сравнению с солидными вариантами) [1, 13], во-вторых, менее выраженные некрозы (для данного типа менее характерны обширные так называемые географические некрозы, типичные для более агрессивных пролиферативных опухолей) [10, 13], в-третьих, более низкую митотическую активность (дифференцированный подтип демонстрирует самый низкий индекс пролиферации Ki-67 среди всех четырех молекулярных подтипов) [10, 17]. Митотический индекс в таких опухолях обычно ниже, чем в пролиферативном подтипе (>30 митозов на 10 полей зрения при большом увеличении микроскопа). Дополнительно стоит отметить, что в рамках дифференцированного подтипа выделяют вариант с SET-морфологией (солидно-псевдоэндометриоидно-переходноклеточный), который тесно связан с мутациями в генах *BRCA1/2* и демонстрирует повышенную чувствительность к препаратам платины и PARP-ингибиторам [10].

Иммунореактивный подтип (immunoreactive subtype)

Морфологические особенности иммунореактивного подтипа включают выраженную лимфоидную инфильтрацию. Данный подтип (по классификации Tothill – C2) выделяется наиболее интенсивным привлечением иммунных клеток среди всех вариантов HGSOC. Гистопатологически он определяется наличием многочисленных лимфоцитов, окружающих опухолевые гнезда (>100 в поле зрения при ×400) и инфильтрирующих их (>50 в поле зрения при ×400) [12]. Характерной чертой является высокая плотность как внутриэпителиальных лимфоцитов (в гнездах опухоли), так и стромальных опухоль-инфильтрирующих. В цифровой патологии из-за сложности визуализации часто используют порог инфильтрации лимфоцитами ≥25% площади стромы [10, 18].

Кроме того, к важным морфологическим признакам данного подтипа относятся воспалительно измененная строма и ровный край инвазии. В отличие от новообразований агрессивного мезенхимального подтипа иммунореактивные опухоли обычно имеют относительно ровный (гладкий) край инвазии и строму, богатую клетками воспаления, но бедную активированными фибробластами [12].

Следует отметить, что иммунореактивные опухоли также могут проявлять SET-морфологию, для которой свойственны солидные пласты клеток с участками географических некрозов и «пышной» лимфоидной инфильтрацией, что напоминает медуллярный рак других локализаций [9].

Биологические особенности иммунореактивного подтипа заключаются в активации интерфероновых и цитокиновых сигнальных путей: на молекулярном уровне выражена экспрессия генов адаптивного иммунного ответа, включая пути интерферона-гамма, сигнализацию Т-клеточных рецепторов и презентацию антигенов [12]. Данному подтипу присуще иммунологически активное микроокружение: наблюдается активация оси CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3, которая критична для рекрутирования иммунных клеток в опухоль. Наряду с этим характерна высокая экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости классов I и II, необходимых для распознавания опухолевых антигенов [19, 20].

К морфологическим признакам, связанным с чувствительностью к терапии для иммунореактивного подтипа, можно отнести плотность CD8+ Т-лимфоцитов: высокое содержание цитотоксических CD8+ Т-клеток является ключевым предиктором благоприятного прогноза и повышенной чувствительности к терапии препаратами платины. Кроме того, наличие резидентных Т-клеток памяти (CD103+) в составе инфильтрата в ткани опухоли также может быть ассоциировано с иммунореактивностью, а долгосрочная выживаемость коррелирует с формированием третичных лимфоидных структур, где происходит взаимодействие Т- и В-клеток [10, 18]. В частности, инфильтрация стромы плазматическими клетками, секретирующими IgG, усиливает противоопухолевый ответ [15]. Важно учитывать и тот факт, что, несмотря на иммунную реактивность, в таких опухолях могут присутствовать макрофаги обоего типа (M1 и M2), а развитие резистентности может быть связано с признаками иммунного истощения (exhaustion), включая экспрессию ингибиторных рецепторов PD-L1/CD274, LAIR-1, IRF4 и LAG-3, что позволяет опухоли избегать элиминации эффекторными иммунными клетками [6, 15]. С клинической точки зрения иммунореактивный подтип считается наиболее прогностически благоприятным, часто диагностируется на более ранних стадиях и лучше поддается успешному хирургическому лечению (циторедукция R0) [16].

Мезенхимальный подтип (mesenchymal subtype)

Морфологические особенности мезенхимального подтипа (в гистопатологической классификации – MT, mesenchymal transition) заключаются в первую очередь

в наличии выраженной десмопластической стромы, занимающей более 10% площади опухоли [12]. В образцах новообразований, относящихся к данному подтипу, строма часто преобладает над опухолевыми клетками (эпителиально-стромальное соотношение меньше 2:1) [21]. Также для мезенхимального подтипа характерен инфильтративный тип роста с наличием двух специфических паттернов инвазии: «лабиринтного» (широкие сосочковые структуры, сдавленные плотной стромой) и паттерна мезенхимального перехода (разобщенные группы клеток, глубоко инфильтрирующие окружающие ткани) [12]. Кроме того, такие опухоли содержат веретенообразные и изолированные клетки, демонстрирующие деструктивный характер роста в очагах десмоплазии, что придает опухоли сходство с мезенхимальными новообразованиями или саркомами [17, 19]. Следует также отметить присущее мезенхимальному подтипу массивное ремоделирование внеклеточного матрикса: подтип характеризуется активацией генов, ответственных за перестройку матрикса, таких как *POSTN* (периостин), *COL11A1*, *LOX*, *VCAN* и *THBS2* [22].

К биологическим особенностям мезенхимального подтипа прежде всего относится активация эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), включая увеличение синтеза N-кадгерина, P-кадгерина, факторов транскрипции (SNAIL, TWIST) и снижение синтеза E-кадгерина [10]. Наряду с этим следует отметить высокую плотность опухоль-ассоциированных фибробластов: мезенхимальный фенотип данных опухолей в значительной степени обусловлен не самими опухолевыми клетками, а опухоль-ассоциированными фибробластами и клетками стромы [22].

С клинической точки зрения мезенхимальный подтип ассоциирован с наименьшей выживаемостью (это касается как общей, так и безрецидивной выживаемости). Частота первичной платинорезистентности у пациенток с этим профилем достигает 63% [10, 21].

При анализе морфологических признаков с точки зрения их связи с химиорезистентностью можно выделить массивную десмоплазию и высокую плотность фибробластов, которая коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом и затрудняет достижение полной циторедукции (R0), приводя к высокой частоте субоптимальных операций [22]. В то же время микроокружение опухолей мезенхимального подтипа характеризуется состоянием хронической гипоксии, которая через сигнальный путь TGF-β дополнительно стимулирует синтез коллагена и механизмы выживания опухолевых стволовых клеток [6]. Дополнительный вклад в формирование химиорезистентности вносят плотный внеклеточный матрикс и аномальная сосудистая сеть, которые создают физический барьер, препятствующий равномерному распределению препаратов платины в ткани и снижающий их эффективную концентрацию внутри опухоли [13, 14]. Следует также отметить, что, несмотря на общую резистентность к платине, ряд исследований указывает на то, что мезенхимальный подтип может проявлять повышенную чувствительность к таксанам и схеме dose-dense TC (еженедельное введение паклитаксела) [23].

Пролиферативный подтип (proliferative subtype)

Пролиферативный подтип (часто обозначаемый как SP – solid and proliferative) гистологически характеризуется преобладанием солидных пластов опухолевых клеток и комплексных железистых структур [1, 12]. Этот подтип имеет общие морфологическое черты с SET-вариантом, который демонстрирует отсутствие классических сосочковых структур и напоминает эндометриоидную или переходноклеточную карциному [9]. Для этого подтипа характерна высокая степень ядерной атипии с наличием крупных, гиперхромных ядер неправильной формы, ядрышки обычно очень крупные и хорошо заметные (эозинофильные) [13, 15]. Определяющими морфологическими чертами подтипа являются крайне высокий уровень митозов (более 30 митозов в 10 полях зрения при большом увеличении) и распространенные некрозы [10]. В зонах солидного роста часто наблюдаются обширные участки географических некрозов, что отражает быстрый рост опухоли, опережающий возможности ее эффективного кровоснабжения [15].

Биологические особенности пролиферативного подтипа заключаются в первую очередь в выраженной геномной нестабильности опухоли. Так, пролиферативный подтип характеризуется наиболее выраженной хромосомной нестабильностью среди всех вариантов HGSOC. На молекулярном уровне это проявляется высокой частотой изменений числа копий генов, высокой плоидностью и наличием множества субклональных мутаций [15]. Ключевой генетической особенностью этого подтипа можно назвать и частую амплификацию генов *CCNE1* (циклин E1) и *MYC*, а также инактивацию генов опухолевых супрессоров *RB1* и *NF1*. Амплификация *CCNE1* часто является взаимоисключающей по отношению к мутациям *BRCA1/2* [2]. Кроме того, биологический профиль пролиферативного подтипа определяется активацией путей, связанных с репликацией ДНК и клеточным ростом, а также усилением сигнализации WNT/β-катенин и Hedgehog [10]. При этом отмечается снижение синтеза классических маркеров дифференцировки эпителия яичника, таких как MUC1 и MUC16 (CA125) [17, 24].

Среди морфологических признаков, которые можно было бы выделить как ассоциированные с химиорезистентностью, следует отметить высокий индекс Ki-67 (данный подтип демонстрирует максимальную экспрессию маркера пролиферации Ki-67 (в 100% случаев) по сравнению с другими молекулярными подтипами) [10]. Хотя высокая пролиферативная активность может коррелировать с первичным ответом на платину, она также связана с быстрым развитием рецидивов и плохим общим прогнозом [9, 25]. К тому же пролифе-

ративный подтип отличает наличие большого количества атипичных фигур митозов, что является маркером глубоких нарушений контрольных точек клеточного цикла и способствует клональной эволюции и выживанию резистентных клонов [9]. Кроме того, присутствие гигантских уродливых ядер и многоядерных клеток в опухолях, относящихся к данному подтипу, часто ассоциировано с недифференцированной гистологической картиной и выраженной геномной нестабильностью, что является морфологическим предиктором агрессивного течения и устойчивости к терапии [13].

Пролиферативный подтип часто диагностируется на поздних стадиях (FIGO III–IV) и наряду с мезенхимальным типом ассоциирован с наихудшими показателями общей выживаемости [9, 10].

Таким образом, различные молекулярные подтипы HGSOC характеризуются не только специфическими транскриптомными и биологическими особенностями, но и отчетливыми морфологическими паттернами, которые могут иметь важное прогностическое и предиктивное значение. Дифференцированный и иммунореактивный подтипы, как правило, ассоциированы с более благоприятным течением заболевания, высокой чувствительностью к платиносодержащей терапии и лучшими показателями выживаемости.

Напротив, мезенхимальный и пролиферативный подтипы демонстрируют признаки выраженной агрессивности, геномной нестабильности, ремоделирования микроокружения и активации механизмов опухолевой пластичности, что тесно связано с формированием химиорезистентности. При этом многие из указанных особенностей могут быть выявлены уже при стандартном гистопатологическом исследовании, включая характер стромальной реакции, выраженность лимфоидной инфильтрации, степень клеточного полиморфизма, особенности архитектуры опухоли и митотическую активность. Это подчеркивает важность интеграции морфологических и молекулярных данных для более точной стратификации пациенток и разработки персонализированных терапевтических подходов при HGSOC.

Морфологические и молекулярные механизмы химиорезистентности при HGSOC

Формирование химиорезистентности при HGSOC представляет собой многофакторный динамический процесс, включающий нарушения репарации ДНК, активацию альтернативных сигнальных путей выживания, эпигенетические изменения, опухолевую пластичность и ремоделирование микроокружения. Существенный вклад в развитие устойчивости к платиносодержащей терапии вносят как собственно опухолевые клетки, так и компоненты стромы, иммунного инфильтрата и внеклеточного матрикса. Морфологические изменения, сопровождающие эти процессы, отражают сложное взаимодействие между молекулярными механизмами резистентности и биологической эволюцией опухоли.

Нарушения репарации ДНК и платинорезистентность

Действие препаратов платины (цисплатин и карбоплатин) основано на образовании внутринитевых и межнитевых сшивок ДНК, которые блокируют процессы репликации и транскрипции, запуская сигнальный каскад апоптоза. Основным механизмом восстановления таких повреждений является гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR) – безошибочный путь репарации двунитевых разрывов ДНК [8]. Около 50% случаев HGSOC характеризуется дефицитом гомологичной рекомбинации, что обусловливает их высокую первичную чувствительность к платине и PARP-ингибиторам (принцип синтетической летальности) [6]. Ключевыми причинами дефицита гомологичной рекомбинации (homologous recombination deficiency, HRD) являются герминальные или соматические мутации в генах *BRCA1* (11–12,5%) и *BRCA2* (8–11,5%), а также эпигенетическое замалчивание (гиперметилирование промотора) *BRCA1* [8].

Другие нарушения включают мутации в генах *RAD51C, CDK12, PTEN, ATM* и *ATR* [6]. Восстановление функции HR происходит за счет реверсивных мутаций в генах *BRCA1/2* или *RAD51C/D*, восстанавливающих рамку считывания белка [8]. Наряду с этим описаны механизмы потери метилирования промотора *BRCA1*, стабилизация мутантного белка BRCA1 шапероном HSP90 и избыточная экспрессия *DDX39B*, стабилизирующая мРНК *BRCA1* [6]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* выполняют критическую функцию по защите репликационных вилок от нуклеолитического расщепления ферментом MRE11, что не зависит от их роли в HR [26]. Утрата этой защиты ведет к геномной нестабильности и чувствительности к терапии [27]. Однако восстановление стабильности репликационных вилок (например, через потерю белков PTIP, PARP1 или CHD4) может привести к развитию платинорезистентности даже при сохраняющемся дефиците HR [8].

Опухоли с мутациями *BRCA1* и статусом HRD статистически значимо чаще демонстрируют SET-морфологию, для которой характерны наличие солидных пластов клеток, географических некрозов, высокий митотический индекс и выраженная инфильтрация опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами [9]. Клинически SET-вариант ассоциирован с лучшим ответом на платину и более благоприятным прогнозом [2, 13].

Выраженная хромосомная нестабильность и вариации числа копий генов в HGSOC коррелируют с тяжелой ядерной атипией [2]. Морфологически это проявляется выраженным клеточным полиморфизмом, наличием гигантских уродливых ядер и многоядерных клеток. Опухоли с максимальной геномной деградацией (подтип LD – lowly differentiated) характеризуются наиболее плотным расположением ядер и наихудшей выживаемостью [1].

Проведение неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) вызывает регрессию опухоли, но также может изменять ее биологические свойства. Исследования показывают снижение синтеза маркеров стволовости (CD44, ALDH) в паренхиме после курсов химиотерапии [28]. В опухолях с SET-паттерном после НАХТ часто наблюдается усиление плотности CD8+ Т-лимфоцитов, что связывают с презентацией антигенов деградировавших опухолевых клеток [10]. Кроме того, в резистентных после терапии очагах может наблюдаться повышение экспрессии HER3, что указывает на активацию альтернативных путей выживания [13].

Микроокружение опухоли и иммунозависимая резистентность

Опухолевое микроокружение в HGSOC представляет собой сложную экосистему, состоящую из злокачественных клеток, стромальных элементов (фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки), сосудов и разнообразных популяций иммунных клеток. Взаимодействие между этими компонентами определяет не только темпы прогрессии заболевания, но и чувствительность к системной терапии [28].

Основную роль в подавлении противоопухолевого ответа играют иммуносупрессивные клетки: регуляторные Т-лимфоциты и миелоидные супрессорные клетки [29]. Они блокируют активацию Т- и В-лимфоцитов, нарушают презентацию антигенов дендритными клетками и ингибируют цитотоксичность NK-клеток. Генетические изменения, такие как дефицит *PTEN*, способствуют формированию супрессивной среды через активацию сигнального пути PI3K/AKT, что ведет к снижению инфильтрации иммунными клетками и укорочению их выживаемости [30].

Опухоль-ассоциированные макрофаги разделяются на противоопухолевый фенотип М1 и проопухолевый (супрессивный) М2 [28]. В платинорезистентных опухолях, особенно при потере PTEN, наблюдается преобладание макрофагов М2, которые секретируют цитокины IL-6, IL-10 и TGF-β, способствуя ангиогенезу и выживанию опухолевых стволовых клеток. Напротив, в иммунореактивном подтипе доминируют М1-макрофаги, связанные с лучшим прогнозом [31]. Длительное воздействие опухолевых антигенов приводит к состоянию иммунного истощения (exhaustion) Т-лимфоцитов [32]. Морфологически это проявляется иммуногистохимической реакцией с ингибиторными рецепторами PD-1, LAG-3, TIM-3 и LAIR-1. Это препятствует реализации цитотоксического потенциала CD8+ Т-клеток даже при их наличии в ткани, что является одной из причин неэффективности иммунотерапии при HGSOC [33].

Морфологические проявления реализации особенностей микроокружения в формировании механизма химиорезистентности заключаются прежде всего в десмопластической реакции и активации стромы. Это особенно характерно для мезенхимального подтипа и проявляется избыточным отложением коллагена и активацией опухоль-ассоциированных фибробластов [28]. Плотная десмопластическая строма создает физический барьер, ограничивающий доступ цитостатиков и иммунных клеток к паренхиме опухоли. Активированные фибробласты через секрецию POSTN и версикана дополнительно стимулируют ЭМП и химиорезистентность [34]. Кроме того, важную роль играет высокая плотность внутриэпителиальных CD8+ Т-лимфоцитов, что связано с HRD статусом новообразования (особенно мутациями *BRCA1*) и максимальной чувствительностью таких опухолей к платинасодержащим препаратам [32, 35].

Кроме того, следует отметить случаи, в которых реализуется сценарий, при котором иммунные клетки присутствуют в строме, но не могут проникнуть в опухолевые гнезда из-за плотного внеклеточного матрикса или действия миелоидных супрессорных клеток. Данные опухоли характеризуются минимальной инфильтрацией лимфоцитами, что часто коррелирует с пролиферативным подтипом и амплификацией *CCNE1* [33].

Выявляется пространственная гетерогенность инфильтрата: плотность инфильтрации существенно варьирует не только у разных пациенток, но и между различными очагами у одной женщины. Метастатические очаги, локализующиеся в большом сальнике, часто имеют более выраженную супрессивную среду по сравнению с первичной опухолью в яичнике. Более того, внутри одной опухоли могут сосуществовать зоны с признаками активного иммунного ответа и зоны «иммунной пустыни», что способствует клональной эволюции и выживанию резистентных субклонов [28, 32].

Доказано, что наличие третичных лимфоидных структур, где взаимодействуют Т- и В-клетки, является сильным морфологическим предиктором длительной выживаемости [33, 36].

Эпигенетические и транскриптомные механизмы

Эпигенетическая регуляция критична в этиологии HGSOC и формировании химиорезистентности [2]. Дефицит гомологичной рекомбинации примерно в половине случаев обусловлен не мутациями, а метилированием промоторов генов репарации, таких как *BRCA1* (10–15%) и *RAD51C* (2%) [6, 26]. Гиперметилирование промотора гена *hMLH1* является известным драйвером приобретенной резистентности к платине. В рецидивирующих опухолях наблюдаются динамические изменения профиля метилирования генов *PDCD1, NKAPL* и *APOBEC3A*, что коррелирует с агрессивным поведением. Применение деметилирующих агентов (гуадецитабин, децитабин) рассматривается как стратегия для ресенсибилизации платинорезистентных опухолей [2, 6].

Различные классы некодирующих РНК (micro RNA, lncRNA, circRNA) участвуют в регуляции ЭМП и выживаемости стволовых клеток. Например, сверхэкспрессия miR-23a-3p ассоциирована с гипоксией и платинорезистентностью. Длинная некодирующая

РНК (lnRNA) HOTAIR рекрутирует комплекс PRC2 для метилирования гистона H3K27, поддерживая фенотип опухолевых стволовых клеток. lncRNA CTBP1-DT кодирует микропротеин DDUP, который напрямую способствует устойчивости к цисплатину [6, 14].

Каждый молекулярный подтип характеризуется активацией специфических каскадов: мезенхимального – активацией путей TGF-β, WNT, ангиогенеза и ремоделирования матрикса (гены *POSTN, FGF2, LTBP4*); иммунореактивного – усилением сигналов интерферона-гамма, сигнализацией Т-клеточных рецепторов и презентации антигенов; пролиферативного – активацией путей клеточного цикла (CCNE1, MYC), репликацией ДНК и сигнализации Hedgehog; дифференцированного – сохранением эстрогензависимых путей и увеличением синтеза эпителиальных маркеров (MUC16, SLPI) [2, 10, 17].

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность

HGSOC проявляется выраженным разнообразием паттернов в пределах одного узла: на срезе могут одновременно присутствовать классические папиллярные и SET-структуры. Использование индекса Шеннона для оценки разнообразия паттернов роста позволяет прогнозировать ответ на химиотерапию. Опухоль представляет собой мозаику из «хабитатов» – зон микроокружения, где экологический баланс между ресурсами и иммунным давлением определяет селекцию резистентных клонов [2].

Эволюция HGSOC в 67% случаев следует модели линейной прогрессии, где метастазы сохраняют основные мутации первичного очага. Однако метастазы в сальнике и опухолевые диссеминаты по брюшине в 90% случаев демонстрируют мезенхимальный фенотип, даже если первичная опухоль яичника относилась к другому подтипу. Это указывает на то, что мезенхимальная сигнатура может быть свойством метастатического микроокружения, а не самих эпителиальных клеток [22, 37].

Неоадъювантная химиотерапия вызывает существенные цитологические изменения – появление гигантских уродливых ядер, вакуолизацию цитоплазмы и снижение митотической активности. На биологическом уровне после НАХТ часто наблюдается снижение синтеза маркеров стволовости (CD44, ALDH) в паренхиме. В процессе прогрессирования и приобретения резистентности опухоль может эволюционировать от «дифференцированного» состояния с относительно сохранным геномом к «пролиферативному» с тотальной геномной нестабильностью и метаболическим переключением [2, 28].

Морфология как суррогатный маркер молекулярного подтипа

Как уже было отмечено, молекулярные подтипы имеют специфические гистопатологические эквиваленты, различимые при окрашивании гематоксилином и эозином: мезенхимальный, иммунореактивный, дифференцированный (папиллогландулярный) и пролиферативный (солидный) [12, 16].

Существует пошаговый алгоритм морфологической классификации, где в первую очередь оценивается наличие мезенхимальных признаков, затем степень иммунной инфильтрации и в последнюю очередь преобладающий архитектурный паттерн (папиллярный или солидный).

Иммуногистохимическое исследование дополняет морфологическую оценку, позволяя объективизировать разделение на подтипы. Для этой цели используют определение экспрессии CD8+ Т-лимфоцитов: высокая плотность CD8+ клеток в строме и паренхиме является ключевым признаком иммунореактивного подтипа, что коррелирует с лучшим прогнозом. Наряду с этим в алгоритм часто включают определение пролиферативного индекса (Ki-67): высокий индекс пролиферации (часто в 100% клеток) характерен для пролиферативного подтипа, тогда как дифференцированный подтип демонстрирует наиболее низкие значения. Экспрессия рецепторов к стероидным гормонам может быть эффективна для выделения пролиферативного подтипа, для которого характерна более высокая экспрессия эстрогенового рецептора [10, 12].

Отдельно следует выделить SET-морфологию HGSOC: наличие признаков солидного, псевдоэндометриоидного или переходноклеточного роста часто коррелирует с мутациями *BRCA1* и статусом HRD, что указывает на высокую чувствительность к препаратам платины и PARP-ингибиторам [9].

Несмотря на перспективность, использование морфологии как суррогатного метода для молекулярного типирования имеет существенные недостатки. Так, согласованность между патоморфологами (коэффициент каппа) часто оценивается как умеренная или даже слабая (к от 0,08 до 0,65). Наиболее сложно диагностируемым является иммунореактивный подтип [23, 38, 39]. Нельзя не учитывать и внутриопухолевую гетерогенность: HGSOC часто представляет собой мозаику, где в одной опухоли могут одновременно присутствовать паттерны разных подтипов [33, 40]. Мезенхимальный «портрет» опухоли при полнотранскриптомном анализе может быть обусловлен не свойствами самих раковых клеток, а большим количеством фибробластов в образце, что искажает классификацию [1, 41].

Для преодоления этих ограничений предлагается использование цифровой патологии и алгоритмов искусственного интеллекта, которые способны более точно и воспроизводимо квантифицировать гистологические признаки и предсказывать молекулярный профиль опухоли [42, 43].

Морфологическая оценка ответа на неоадъювантную химиотерапию

Неоадъювантная химиотерапия с последующей интервальной циторедуктивной хирургией является стан-

дартом лечения для пациенток с распространенными стадиями HGSOC, у которых первичная оптимальная операция невозможна [44]. Оценка патоморфологического регресса позволяет объективно измерить эффективность проведенного лечения [3, 9].

В клинической практике для определения ответа на HAXT используется трехбалльная система оценки ответа опухоли на неоадъювантную химиотерапию (Chemotherapy Response Score, CRS), разработанная преимущественно для исследования образцов сальника. CRS 1 (минимальный ответ): обнаруживается значительный объем жизнеспособной опухоли с минимальными признаками регресса или их отсутствием. CRS 2 (частичный ответ): жизнеспособная опухоль сохраняется, но в сочетании с выраженными признаками терапевтического патоморфоза (фиброз, воспаление). CRS 3 (полный или почти полный ответ): жизнеспособная опухоль отсутствует или представлена лишь в виде микроскопических фокусов (отдельные клетки или группы до 2 мм) на фоне массивного регресса [27, 28, 45].

В исследуемых когортах пациенток, получавших HAXT (схема паклитаксел + карбоплатин), наиболее часто встречаются ответы уровня CRS 1 и CRS 2 (до 43–50%), в то время как полный ответ (CRS 3) наблюдается значительно реже (около 7%) [28].

Химиотерапия вызывает глубокую перестройку как самой опухолевой ткани, так и ее микроокружения: цитологические изменения – характерны появление гигантских уродливых ядер, выраженный ядерный полиморфизм, вакуолизация цитоплазмы опухолевых клеток и общее снижение плотности опухолевой популяции; снижение пролиферации: после воздействия платиновых дериватов и таксанов отмечается резкое падение митотической активности – в остаточных очагах часто определяется менее 1–5 митозов на 1 мм² ткани; изменения в популяции стволовых клеток: HAXT приводит к снижению процента клеток, экспрессирующих маркеры стволовости (CD44 и ALDH) в паренхиме остаточной опухоли [45, 46]. Однако в платиночувствительных опухолях после лечения парадоксально может сохраняться более высокий процент CD44+ клеток; реакция микроокружения: терапия индуцирует локальные изменения, включая активацию CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов [28, 47, 48]. Это связывают с презентацией антигенов деградировавших под действием химии опухолевых клеток, что наиболее выражено в опухолях с SET-паттерном [10, 48, 49].

Остаточная опухоль после HAXT часто меняет свою архитектуру. Паренхима может быть представлена солидными разрастаниями или солидно-папиллярными структурами, состоящими из светлых клеток округлой либо вытянутой формы. Нередко наблюдаются крупные светлые пузырьковидные ядра с отчетливыми эозинофильными ядрышками [50, 51]. В зонах регресса опухоль замещается плотной фиброзной тканью с признаками хронического воспаления, при этом в некоторых подтипах (например, мезенхимальном) сохраняется выраженная десмопластическая реакция, затрудняющая полную элиминацию раковых клеток [28, 38].

Таким образом, морфологическая оценка после HAXT позволяет не только стадировать ответ по системе CRS, но и выявлять биологическую эволюцию опухоли, включая селекцию химиорезистентных клонов и изменения в иммунном статусе микроокружения [52].

Перспективы персонализированной терапии

Разработка стратегий лечения HGSOC все чаще опирается на глубокое понимание биологических различий между молекулярными подтипами, что позволяет перейти от стандартных схем к персонализированной онкологии [53].

Дефицит гомологичной рекомбинации – ключевая уязвимость примерно для 50% случаев HGSOC [4, 8]. Основная терапевтическая стратегия здесь – использование PARP-ингибиторов (олапариб, рукапариб, нирапариб), действие которых основано на принципе синтетической летальности [54].

Перспективным направлением является переход от статических геномных тестов («геномных шрамов») к функциональным анализам на органоидах пациента, которые позволяют оценить реальную способность опухолевых клеток восстанавливать ДНК в текущий момент времени, учитывая возможность реверсивных мутаций и приобретенную резистентность [33].

Для преодоления устойчивости разрабатываются комбинации PARP-ингибиторов с ингибиторами ATR, CHK1/2 и WEE1. Эти препараты усиливают репликативный стресс, лишая опухолевые клетки альтернативных путей выживания [4, 8].

При иммунореактивном подтипе, который характеризуется «горячим» микроокружением с высокой плотностью внутриэпителиальных CD8+ Т-лимфоцитов и активацией интерфероновых путей, возможно рассмотрение иммунотерапии в качестве лечебной стратегии [18]. В этом подтипе часто наблюдается выраженная иммуногистохимическая реакция с PD-L1, что обосновывает применение анти-PD-1/PD-L1 антител [20, 55].

Поскольку PARP-ингибиторы способны активировать сигнальный путь STING, перспективным считается их сочетание с ICI для усиления противоопухолевого иммунного ответа [8, 40, 56]. Также исследуется роль экзогенных агонистов STING для реполяризации макрофагов из проопухолевого M2 в цитотоксический M1 фенотип [44, 57].

Наличие третичных лимфоидных структур в строме иммунореактивных опухолей служит важным предиктором эффективности иммунотерапии и долгосрочной выживаемости [7].

Мезенхимальный подтип ассоциирован с наиболее агрессивным течением и физическим барьером в виде массивной десмоплазии, что требует особых подходов. Исследования (в частности, JGOG3016) показали, что пациентки с данным подтипом опухоли получают

значительное преимущество от еженедельного введения паклитаксела (режим dose-dense): такой подход эффективнее преодолевает стромальную резистентность и воздействует на ангиогенез [58]. Поскольку TGF-сигнальный путь является драйвером эпителиально-мезенхимального перехода и фиброза в мезенхимальном подтипе, применение анти-TGF-антител (например, фрезолимумаба) рассматривается как способ «смягчения» стромы и восстановления чувствительности к платине [16, 59]. Мезенхимальные опухоли наиболее чувствительны к ингибиторам VEGF (бевацизумаб), так как их биология тесно сплетена с интенсивным неоангиогенезом [60]. Связь мезенхимального фенотипа с опухолевой стволовостью делает этот подтип мишенью для CSC-ориентированных препаратов (метформин, ингибиторы сигнальных путей Wnt и Hedgehog) [4].

Заключение

Серозная карцинома яичника высокой степени злокачественности представляет собой биологически и морфологически гетерогенную группу опухолей, что во многом определяет различия в клиническом течении, ответе на платиносодержащую химиотерапию и риске формирования химиорезистентности. Современные молекулярные классификации позволяют выделить четыре основных подтипа серозной карциномы яичника высокой степени злокачественности: дифференцированный, иммунореактивный, мезенхимальный и пролиферативный. Эти подтипы различаются не только транскриптомными профилями, но и морфологическими признаками, которые могут быть оценены при рутинном гистологическом исследовании.

Ключевые механизмы устойчивости к химиотерапии включают восстановление гомологичной рекомбинации, реверсивные мутации *BRCA1/2*, эпигенетические изменения и влияние опухолевого микроокружения с формированием зон иммунного исключения и селекцией резистентных клонов.

Морфологическая гетерогенность служит суррогатным маркером биологического поведения опухоли, а интеграция гистологической оценки с иммуногистохимией, молекулярным профилированием и методами искусственного интеллекта открывает перспективы для точной стратификации пациенток, прогнозирования ответа на терапию и разработки персонализированных стратегий преодоления химиорезистентности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Ahn B, Park E.* Categorizing high-grade serous ovarian carcinoma into clinically relevant subgroups using deep learning–based histomic clusters. J Pathol Transl Med. 2025;59(20):91–104. DOI: 10.4132/jptm.2024.10.23.
2. *Azzalini E, Stanta G, Canzonieri V, Bonin S.* Overview of tumor heterogeneity in high-grade serous ovarian cancers. Int J Mol Sci. 2023;24(20):15077. DOI: 10.3390/ijms242015077.
3. *Martín-Vallejo J, Berenguer-Marí JR, Bosch-Romeu R, Sierra-Roca J, Tadeo-Cervera I, Pardo J et al.* Prognostic relevance of clinical and tumor mutational profile in high-grade serous ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2025;26(15):7416. DOI: 10.3390/ijms26157416.
4. *Miras I, Estévez-García P, Muñoz-Galván S.* Clinical and molecular features of platinum resistance in ovarian cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2024;201:104434. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104434.
5. *Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Генинг С.О., Антонеева И.И., Песков А.Б. и др.* Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцита у больных раком яичников. Антибиотики и химиотерапия. 2019;64(5-6):18–21. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100026.
Dolgova DR, Gening TP, Abakumova TV, Gening SO, Antoneeva II, Pescov AB et al. Markers of primary chemoresistance of epithelial ascites cells in patients with ovarian cancer. Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy. 2019;64(5-6):18–21 (In Russ.). DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100026.
6. *Li H, Sheng JJ, Zheng SA, Liu PW, Wu N, Zeng WJ et al.* Platinum-resistant ovarian cancer: from mechanisms to treatment strategies. Genes Dis. 2025;13(2):101801. DOI: 10.1016/j.gendis.2025.101801.
7. *Boudreau JE.* Immune-molecular interactions in high-grade serous ovarian cancer distinguish long-term survivors. J Clin Invest. 2024;134(24):e184790. DOI: 10.1172/JCI184790.
8. *Stefanou DT, Souliotis VL, Zakopoulou R, Liontos M, Bamias A.* DNA Damage repair: predictor of platinum efficacy in ovarian cancer? Biomedicines. 2021;10(1):82. DOI: 10.3390/biomedicines10010082.
9. *Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C.* High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. Int J Mol Sci. 2019;20(4):952. DOI: 10.3390/ijms20040952.
10. *Khashaba M, Fawzy M, Abdel-Aziz A, Eladawei G, Nagib R.* Subtyping of high grade serous ovarian carcinoma: histopathological and immunohistochemical approach. J Egypt Natl Cancer Inst. 2022;34(1):6. DOI: 10.1186/s43046-022-00104-9.
11. *Атаи А., Соловьева В.В., Ризванов А.А., Араб С.Ш.* Микроокружение опухоли: ключевой фактор развития рака, инвазии и лекарственной устойчивости. Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки». 2020;162(4):507–528. DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.507-528.
Ataei A, Solovyeva VV, Rizvanov AA, Arab SSh. Tumor microenvironment: a key contributor to cancer progression, invasion, and drug resistance. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki = Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series. 2020;162(4):507–528 (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.507-528.
12. *Murakami R, Matsumura N, Mandai M, Yoshihara K, Tanabe H, Nakai H et al.* Establishment of a novel histopathological classification of high-grade serous ovarian carcinoma correlated with

prognostically distinct gene expression subtypes. Am J Pathol. 2016;186(5):1103–13. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.12.029.
13. *Giannini R, Bartoli F, Ieso K, Camacci T, Bertolucci A, Piccini L et al.* Transcriptomic profiling of the tumor microenvironment in high-grade serous carcinoma: a pilot study of morphologic and molecular distinctions between classic and SET patterns. Int J Mol Sci. 2025;26(20):10229. DOI: 10.3390/ijms262010229.
14. *Fu R, Hu R, Li W, Lv X, Zhao H, Li F.* Unveiling drug resistance pathways in high-grade serous ovarian cancer(HGSOC): recent advances and future perspectives. Front Immunol. 2025;16:1556377. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1556377.
15. *Olbrecht S, Busschaert P, Qian J, Vanderstichele A, Loverix L, Van Gorp T et al.* High-grade serous tubo-ovarian cancer refined with single-cell RNA sequencing: specific cell subtypes influence survival and determine molecular subtype classification. Genome Med. 2021;13(1):111. DOI: 10.1186/s13073-021-00922-x.
16. *Ohsuga T, Yamaguchi K, Kido A, Murakami R, Abiko K, Hamanishi J et al.* Distinct preoperative clinical features predict four histopathological subtypes of high-grade serous carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. BMC Cancer. 2017;17(1):580. DOI: 10.1186/s12885-017-3573-1.
17. *Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S et al.* Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. Clin Cancer Res. 2008;14(16):5198–208. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0196.
18. *Miyagawa C, Nakai H, Otani T, Murakami R, Takamura S, Takaya H et al.* Histopathological subtyping of high-grade serous ovarian cancer using whole slide imaging. J Gynecol Oncol. 2023;34(4):e47. DOI: 10.3802/jgo.2023.34.e47.
19. *Kobelyatskaya AA, Tregubova AV, Palicelli A, Badlaeva AS, Asaturova AV.* OVsignGenes: a gene expression-based neural network model estimated molecular subtype of high-grade serous ovarian carcinoma. Cancers (Basel). 2024;16(23):3951. DOI: 10.3390/cancers16233951.
20. *Konecny GE, Wang C, Hamidi H, Winterhoff B, Kalli KR, Dering J et al.* Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. J Natl Cancer Inst. 2014;106(10):dju249. DOI: 10.1093/jnci/dju249.
21. *Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ et al.* Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. J Clin Invest. 2013;123(1):517–25. DOI: 10.1172/JCI65833.
22. *Hu Y, Taylor-Harding B, Raz Y, Haro M, Recouvreux MS, Taylan E et al.* Are epithelial ovarian cancers of the mesenchymal subtype actually intraperitoneal metastases to the ovary? Front Cell Dev Biol. 2020;8:647. DOI: 10.3389/fcell.2020.00647.
23. *Murakami R, Matsumura N, Michimae H, Tanabe H, Yunokawa M, Iwase H et al.* The mesenchymal transition subtype more responsive to dose dense taxane chemotherapy combined with carboplatin than to conventional taxane and carboplatin chemotherapy in high grade serous ovarian carcinoma: a survey of Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG3016A1). Gynecol Oncol. 2019;153(2):312–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.02.010.
24. *Davidson NR, Barnard ME, Hippen AA, Campbell A, Johnson CE, Way GP et al.* Molecular subtypes of high-grade serous ovarian cancer across racial groups and gene expression platforms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2024;33(8):1114–25. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-24-0113.25.
25. *Murakami R, Matsumura N, Brown JB, Wang Z, Yamaguchi K, Abiko K et al.* Prediction of taxane and platinum sensitivity in ovarian cancer based on gene expression profiles. Gynecol Oncol. 2016;141(1):49–56. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.02.027.
26. *Damia G, Broggini M.* Platinum resistance in ovarian cancer: role of DNA repair. Cancers (Basel). 2019;11(1):119. DOI: 10.3390/cancers11010119.
27. *Hill SJ, Decker B, Roberts EA, Horowitz NS, Muto MG, Worley MJ et al.* Prediction of DNA repair inhibitor response in short term patient-derived ovarian cancer organoids. Cancer Discov. 2018;8(11):1404–21. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474.
28. *Генинг С.О., Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Слесарева Е.В.* Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(4)63–71. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63-71.
Gening SO, Antoneeva II, Abakumova TV, Gening TP, Slesareva EV. Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer. Clinical and experimental morphology. 2021;10(4):63–71 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63-71.
29. *Okła K, Czerwonka A, Wawruszak A, Bobiński M, Bilska M, Tarkowski R et al.* Clinical relevance and immunosuppressive pattern of circulating and infiltrating subsets of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in epithelial ovarian cancer. Front Immunol. 2019;10:691. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00691.
30. *Okła K.* Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in ovarian cancer-looking back and forward. Cells. 2023;12(14):1912. DOI: 10.3390/cells12141912.
31. *Macciò A, Gramignano G, Cherchi MC, Tanca L, Melis L, Madeddu C.* Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients. Sci Rep. 2020;10(1):6096. DOI: 10.1038/s41598-020-63276-1.
32. *Salvioni A, Michelas M, Del M, Vuattoux P, Segier B, Scarlata CM et al.* Terminal T-cell exhaustion predicts tumor control independent of immunotherapy in ovarian cancer. NPJ Precis Oncol. 2026;10(1):212. DOI: 10.1038/s41698-026-01412-2.
33. *Schwede M, Waldron L, Mok SC, Wei W, Basunia A, Merritt MA et al.* The impact of stroma admixture on molecular subtypes and prognostic gene signatures in serous ovarian cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2020;29(2):509–19. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1359.
34. *Zhang F, Cui JY, Gao HF, Yu H, Gao FF, Chen JL et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer via CXCL12/CXCR4 axis. Future Oncol. 2020;16(32):2619–33. DOI: 10.2217/fon-2020-0095.
35. *Xie T, Dickson KA, Yee C, Ma Y, Ford CE, Bowden NA et al.* Targeting homologous recombination deficiency in ovarian cancer with PARP inhibitors: synthetic lethal strategies that impact overall survival. Cancers (Basel). 2022;14(19):4621. DOI: 10.3390/cancers14194621.

36. *MacFawn IP, Magnon G, Gorecki G, Kunning S, Rashid R, Kaiza ME et al.* The activity of tertiary lymphoid structures in high grade serous ovarian cancer is governed by site, stroma, and cellular interactions. Cancer Cell. 2024;42(11):1864–81.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.09.007.
37. *Masoodi T, Siraj S, Siraj AK, Azam S, Qadri Z, Parvathareddy SK et al.* Genetic heterogeneity and evolutionary history of high-grade ovarian carcinoma and matched distant metastases. Br J Cancer. 2020;122(8):1219–30. DOI: 10.1038/s41416-020-0763-4.
38. *Zelisse HS, Hwan RA, van de Vijver MJ, Dijk F, Mom CH, Hooijer GKJ et al.* Evaluation of the prognostic potential of histopathological subtyping in high-grade serous ovarian carcinoma. Virchows Arch. 2025;486(2):381–91. DOI: 10.1007/s00428-024-03807-7.
39. *Асатурова А.В., Бадлаева А.С., Трегубова А.В., Шамаракова М.В., Занозин А.С., Рогожин Д.В. и др.* Воспроизводимость определения молекулярных подтипов серозной карциномы высокой степени злокачественности с помощью морфологических критериев. Новости клинической цитологии России. 2023;27(2):5–10. DOI: 10.24412/1562-4943-2023-2-0001.
Asaturova AV, Badlaeva AS, Tregubova AV, Shamarakova MV, Zanozin AS, Rogozhin DV et al. Reproducibility of high-grade serous carcinoma molecular subtyping with morphological criteria. Russian News of Clinical Cytology. 2023;27(2):5–10. DOI: 10.24412/1562-4943-2023-2-0001.
40. *Li S, Wang Z, Huang HD.* Deciphering ovarian cancer heterogeneity through spatial transcriptomics, single-cell profiling, and copy number variations. PLoS One. 2025;20(3):e0317115. DOI: 10.1371/journal.pone.0317115.
41. *Xing F, Saidou J, Watabe K*. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. Front Biosci (Landmark Ed). 2010;15(1):166–79. DOI: 10.2741/3613.
42. *Asaturova A, Pinto J, Polonia A, Karpulevich E, Mattias-Guiu X, Eloy C.* Artificial intelligence tools for supporting histopathologic and molecular characterization of gynecological cancers: a review. J Clin Med. 2025;14(21):7465. DOI: 10.3390/jcm14217465.
43. *Ueda A, Nakai H, Miyagawa C, Otani T, Yoshida M, Murakami R et al.* Artificial intelligence-based histopathological subtyping of high-grade serous ovarian cancer. Am J Pathol. 2024;194(10):1913–23. DOI: 10.1016/j.ajpath.2024.06.010.
44. *Marchetti C, Ferron G, Colomban O, Giannarelli D, Blanc-Durand F, Scambia G et al.* Predictors of successful neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreductive surgery in management of ovarian cancer. JCO Oncol Pract. 2025;OP2500469. DOI: 10.1200/OP-25-00469.
45. *Zannoni GF, Angelico G, Spadola S, Bragantini E, Troncone G, Fraggetta F et al.* Chemotherapy Response Score (CRS): a comprehensive review of its prognostic and predictive value in high-grade serous carcinoma (HGSC). Gynecol Oncol. 2025;194:1–10. DOI: 10.1016/j.ygyno.2025.01.012.
46. *Arend RC, Londoño AI, Montgomery AM, Smith HJ, Dobbin ZC, Katre AA et al.* Molecular response to neoadjuvant chemotherapy in high-grade serous ovarian carcinoma. Mol Cancer Res. 2018;16(5):813–24. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0594.
47. *Zhang BL, Gao W, He L, Liu XT, Wang ZM, Tan L.* Functional heterogeneity and clinical implications of CD4+ T cell subtypes in high-grade serous ovarian carcinoma. World J Clin Oncol. 2025;16(5):104138. DOI: 10.5306/wjco.v16.i5.104138.
48. *Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P.* Pathways of antigen processing. Annu Rev Immunol. 2013;31:443–73. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.
49. *Böhm S, Montfort A, Pearce OM, Topping J, Chakravarty P, Everitt GL et al.* Neoadjuvant chemotherapy modulates the immune microenvironment in metastases of tubo-ovarian high-grade serous carcinoma. Clin Cancer Res. 2016;22(12):3025–36. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2657.
50. *Lepe M, Mejia E, Bu Y, Hecht JL.* Morphologic characteristics seen in high-grade serous ovarian carcinoma metastases in postneoadjuvant chemotherapy resections. Int J Gynecol Pathol. 2025;44(5):407–11. DOI: 10.1097/PGP.0000000000001084.
51. *Ivantsov AO.* Pathological response of ovarian cancer to neoadjuvant chemotherapy. Chin Clin Oncol. 2018;7(6):59. DOI: 10.21037/cco.2018.09.07.
52. *Huo C, Wu B, Ye D, Xu M, Ma S, Cheng A et al.* New prognostic index for neoadjuvant chemotherapy outcome in patients with advanced high-grade serous ovarian cancer. BMC Cancer. 2024;24(1):1536. DOI: 10.1186/s12885-024-13324-0.
53. *Kordowitzki P, Lange B, Elias KM, Haigis MC, Mechsner S, Braicu IE et al.* Transforming treatment paradigms: focus on personalized medicine for high-grade serous ovarian cancer. CA Cancer J Clin. 2025;75(5):436–60. DOI: 10.3322/caac.70008.
54. *Bound NT, Vandenberg CJ, Kartikasari AER, Plebanski M, Scott CL.* Improving PARP inhibitor efficacy in high-grade serous ovarian carcinoma: a focus on the immune system. Front Genet. 2022;13:886170. DOI: 10.3389/fgene.2022.886170.
55. *Kandalaft LE, Dangaj Laniti D, Coukos G.* Immunobiology of high-grade serous ovarian cancer: lessons for clinical translation. Nat Rev Cancer. 2022;22(11):640–56. DOI: 10.1038/s41568-022-00503-z.
56. *Shakfa N, Li D, Conseil G, Lightbody ED, Wilson-Sanchez J, Hamade A et al.* Cancer cell genotype associated tumor immune microenvironment exhibits differential response to therapeutic STING pathway activation in high-grade serous ovarian cancer. J Immunother Cancer. 2023;11(4):e006170. DOI: 10.1136/jitc-2022-006170.
57. *Amouzegar A, Chelvanambi M, Filderman JN, Storkus WJ, Luke JJ.* STING agonists as cancer therapeutics. Cancers (Basel). 2021;13(11):2695. DOI: 10.3390/cancers13112695.
58. *Chen J, Shi X, Xiao L, Li Z, Li Z, Sun L.* Better or worse? The prognostic role of the mesenchymal subtype in patients with high-grade serous ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2022;11(20):3761–70. DOI: 10.1002/cam4.4752.
59. *Roane BM, Meza-Perez S, Katre AA, Goldsberry WN, Randall TD, Norian LA et al.* Neutralization of TGFβ improves tumor immunity and reduces tumor progression in ovarian carcinoma. Mol Cancer Ther. 2021;20(3):602–11. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0412.
60. *Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D et al.* VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. Cancer Cell. 2012;22(1):21–35. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.037.

Информация об авторах

Александра Вячеславовна Асатурова – доктор медицинских наук, заведующая 1-м патологоанатомическим отделением НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии Института биологии и патологии человека РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Анна Васильевна Трегубова – научный сотрудник, врач-патологоанатом 1-го патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Анжелика Владимировна Тимофеева – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции Института трансляционной медицины НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Иван Сергеевич Федоров – младший научный сотрудник лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции Института трансляционной медицины НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Александра Сергеевна Рогожина – младший научный сотрудник, врач-патологоанатом 1-го патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Алина Станиславовна Бадлаева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, врач-патологоанатом 1-го патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии Института биологии и патологии человека РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Максим Денисович Барков – врач-стажер централизованного патологоанатомического отделения ТГКБСМП им. Д.Я. Ваныкина.

Author information

Aleksandra V. Asaturova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department No. 1, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Associate Professor, Department of Anatomic Pathology and Clinical Anatomic Pathology, Institute of Human Biology and Pathology, Pirogov Russian National Research Medical University.
https://orcid.org/0000-0001-8739-5209

Anna V. Tregubova – Researcher, Pathologist, Pathology Department No. 1, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.
https://orcid.org/0000-0003-4601-1330

Angelika V. Timofeeva – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Applied Transcriptomics, Department of Systems Biology in Reproduction, Institute of Translational Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.
https://orcid.org/0000-0003-2324-9653

Ivan S. Fedorov – Junior Researcher, Laboratory of Applied Transcriptomics, Department of Systems Biology in Reproduction, Institute of Translational Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.
https://orcid.org/0000-0002-2104-5887

Aleksandra S. Rogozhina – Junior Researcher, Pathologist, Pathology Department No. 1, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.
https://orcid.org/0009-0009-6244-1219

Alina S. Badlaeva – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Pathologist, Pathology Department No. 1, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Associate Professor, Department of Anatomic Pathology and Clinical Anatomic Pathology, Institute of Human Biology and Pathology, Pirogov Russian National Research Medical University.
https://orcid.org/0000-0001-5223-9767

Maksim D. Barkov – Resident Physician, Centralized Anatomic Pathology Department, D.Ya. Vanykin Tula City Clinical Emergency Hospital.
https://orcid.org/0009-0006-8933-4585

© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.18-29 УДК: [576.3]: 004.932.2

Морфофункциональные особенности иммунного микроокружения слизистой оболочки ротоглотки при ВПЧ-ассоциированных, ВПЧ-неассоциированных и рецидивирующих папилломах

Б.О. Щеглов[1], С.В. Иченко[1], И.В. Рева[1], А.С. Золотов[1], Ю.А. Красников[1], С.Н. Щеглова[2], А.Р. Ким[3], Ю.И. Гайнуллина[4], Г.В. Рева[1]

[1] ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
[2] ФГБОУ ВО Северо-восточный государственный университет, Магадан, Россия
[3] ООО «ДЕНТАЛЛЮКС СЕРВИС», Владивосток, Россия
[4] ФГБОУ ВО Владивостокский государственный университет, Владивосток, Россия

Резюме. *Введение.* Патологии слизистой оболочки ротоглотки, в частности поражения, ассоциированные с ВПЧ (вирус папилломы человека), представляют значительный клинико-морфологический интерес в связи с ростом их распространенности, риском рецидивирования и потенциальной злокачественной трансформации. Целью исследования является изучение морфофункциональных особенностей иммунного микроокружения слизистой оболочки ротоглотки при папилломах с учетом ВПЧ-статуса и рецидивирующего течения заболевания с использованием иммуногистохимической оценки CD163 и Ki-67.

Материалы и методы. Материал составили 92 наблюдения, включая 23 образца группы сравнения и 69 биоптатов слизистой оболочки ротоглотки с разными вариантами папилломатозных изменений. Проведено сравнительное исследование с оценкой распределения, количества и интенсивности иммуногистохимической реакции CD163+ клеток, а также уровня пролиферативной активности по Ki-67.

Результаты. Установлено, что папилломатозные изменения сопровождаются выраженной перестройкой макрофагального звена иммунного микроокружения и неоднородностью пролиферативной активности эпителия. Наиболее высокий уровень реакции на CD163 выявлен при папилломах, не ассоциированных с ВПЧ, тогда как максимальные значения Ki-67 характерны для ВПЧ-ассоциированных поражений. Рецидивирующие папилломы отличались умеренной реакцией на CD163 и минимальной пролиферативной активностью, что может отражать персистирующий вариант течения процесса.

Заключение. Полученные данные обосновывают целесообразность комплексной оценки маркеров CD163 и Ki-67 для уточнения морфологической характеристики и биологического поведения папиллом ротоглотки.

Ключевые слова: ротоглотка, папилломы, вирус папилломы человека, иммунное микроокружение, CD163, Ki-67, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Богдан Олегович Щеглов. E-mail: b.shcheglov@mail.ru

Для цитирования: Щеглов Б.О., Иченко С.В., Рева И.В., Золотов А.С., Красников Ю.А., Щеглова С.Н., Ким А.Р., Гайнуллина Ю.И., Рева Г.В. Морфофункциональные особенности иммунного микроокружения слизистой оболочки ротоглотки при ВПЧ-ассоциированных, ВПЧ-неассоциированных и рецидивирующих папилломах. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):18–29. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.18-29.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 04.08.2026. **Получена после рецензирования** 20.08.2026. **Принята в печать** 05.10.2026.

Morphofunctional features of immune microenvironment of the oropharyngeal mucosa in HPV-associated, HPV-non-associated, and recurrent papillomas

B.O. Shcheglov[1], S.V. Ichenko[1], I.V. Reva[1], A.S. Zolotov[1], Yu.A. Krasnikov[1], S.N. Shcheglova[2], A.R. Kim[3], Yu.I Gaynullina[4], G.V. Reva[1]

[1] Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia
[2] North-Eastern State University, Magadan, Russia
[3] LLC "DENTALLUX SERVICE", Vladivostok, Russia
[4] Vladivostok State University, Vladivostok, Russia

Abstract. *Introduction.* Oropharyngeal mucosal pathology, particularly HPV-associated lesions, is of significant clinical and morphological interest due to its increasing prevalence, risk of recurrence, and potential malignant transformation. The study aimed to investigate the morphofunctional features of the immune microenvironment of the oropharyngeal mucosa in papillomas with different HPV statuses and in recurrent disease using immunohistochemical assessment of CD163 and Ki-67.

Materials and methods. We analyzed 92 samples, including 23 comparison group samples and 69 oropharyngeal mucosal biopsies with various papillomatous lesions. A comparative study was conducted assessing the distribution, quantity, and expression intensity of CD163+ cells, as well as the level of proliferative activity based on Ki-67.

Results. Papillomatous changes were found to be accompanied by significant restructuring of the macrophage component of the immune microenvironment and heterogeneity in the proliferative epithelial activity. The highest CD163 expression was detected in HPV-non-associated papillomas, while maximum Ki-67 values were characteristic of HPV-associated lesions. Recurrent papillomas were characterized by moderate CD163 expression and minimal proliferative activity, which may reflect the persistence of the disease.

Conclusion. The obtained data substantiate the feasibility of a comprehensive assessment of CD163 and Ki-67 markers to clarify the morphological characteristics and biological behavior of oropharyngeal papillomas.

Keywords: oropharynx, papillomas, human papillomavirus, immune microenvironment, CD163, Ki-67, immunohistochemistry

Corresponding author: Bogdan O. Shcheglov. E-mail: b.shcheglov@mail.ru

For citation: Shcheglov B.O., Ichenko S.V., Reva I.V., Zolotov A.S., Krasnikov Yu.A., Shcheglova S.N., Kim A.R., Gaynullina Yu.I., Reva G.V. Morphofunctional features of immune microenvironment of the oropharyngeal mucosa in HPV-associated, HPV-non-associated, and recurrent papillomas. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):18–29 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.18-29.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

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

Received 04.08.2026. **Received in revised form** 20.08.2026. **Accepted** 05.10.2026.

Введение

В последние годы патологии ротоглотки приобретают особую значимость в связи с устойчивым ростом числа случаев плоскоклеточных новообразований данной локализации, существенная доля которых ассоциирована с персистирующей инфекцией вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска [1–3]. Современные эпидемиологические данные свидетельствуют о неуклонном увеличении частоты ВПЧ+ орофарингеального плоскоклеточного рака, который в настоящее время рассматривается как самостоятельный биологический и клинико-патологический вариант опухолевого процесса, отличающийся от ВПЧ− форм по молекулярным характеристикам, клиническому течению, чувствительности к терапии и прогнозу [1, 4–7]. Несмотря на значительный объем накопленных сведений о роли вирусных онкобелков в нарушении клеточного цикла, инактивации регуляторных сигнальных путей и формировании пролиферативных преимуществ трансформированного эпителия, многие ключевые звенья малигнизации слизистой оболочки ротоглотки (СОР) остаются недостаточно изученными, особенно в части взаимодействия эпителиального пласта с клеточными и внеклеточными компонентами локального тканевого микроокружения.

Именно микроокружение эпителия ротоглотки в настоящее время следует рассматривать как одну из центральных биологических систем, определяющих характер ответа ткани на персистирующую вирусную инфекцию, устойчивость к иммунному надзору, возможность структурной перестройки базальной мембраны, формирование инвазивного фенотипа и последующее прогрессирование патологического процесса [2–4, 8]. В пределах слизистой ротоглотки

эпителиальные клетки существуют не изолированно, а в тесной связи с собственной пластинкой слизистой оболочки, клетками воспалительного и иммунного ряда, сосудистым руслом, межклеточным матриксом и стромальными элементами, образующими динамически изменяющуюся морфофункциональную среду [4, 9–11]. В этих условиях персистенция ВПЧ не может рассматриваться исключительно как внутриклеточное событие, ограниченное поражением базального эпителия, поскольку вирус-индуцированная трансформация реализуется на фоне сложных межклеточных взаимодействий, затрагивающих механизмы локального иммунного контроля, тканевой репарации, ангиогенеза, клеточной пролиферации и деградации соединительнотканных структур.

Больше того, актуальность приобретает изучение тех изменений микроокружения, которые предшествуют инвазивному росту либо сопровождают его на ранних стадиях [1, 7]. Для опухолевой прогрессии принципиальное значение имеет не только наличие клеток иммунного инфильтрата, но и степень сохранности их функционального состояния, так как морфологически определяемое присутствие клеточных элементов не всегда эквивалентно их полноценной эффекторной активности. В связи с этим возрастает роль иммуногистохимических подходов, позволяющих уточнять фенотипическую принадлежность клеток и оценивать их морфофункциональные характеристики в зоне эпителиально-стромальных взаимодействий. Наиболее информативным представляется анализ маркеров, отражающих состояние макрофагального звена и пролиферативную активность эпителия, поскольку именно они позволяют приблизиться к пониманию соотношения между интенсивностью клеточного обновления, выраженностью местного иммунного ответа и особенностями тканевой перестройки в очаге поражения [3, 8, 10].

Существенным ограничением современной диагностики и прогностической оценки заболеваний ротоглотки остается преобладание традиционного морфологического подхода, при котором основное внимание уделяется гистологическому типу поражения, степени дисплазии, наличию инвазии и ряду стандартных клинико-морфологических признаков [6, 9]. При этом такой подход не в полной мере отражает биологическую неоднородность поражений, особенно при папилломатозных изменениях и ранней малигнизации, когда решающее значение могут иметь тонкие различия в состоянии локального клеточного микроокружения. Данное обстоятельство приобретает особую практическую значимость при выборе объема хирургического вмешательства, определении риска рецидивирования и оценке вероятности дальнейшей опухолевой прогрессии. В данном контексте представляется перспективным изучение иммунного микроокружения эпителия ротоглотки как морфофункциональной системы, в которой количественные параметры клеточной инфильтрации должны рассматриваться в неразрывной связи с интенсивностью иммуногистохимической экспрессии соответствующих маркеров и с характеристиками пролиферативной активности эпителиальных клеток.

Несмотря на интенсивное развитие исследований, посвященных ВПЧ-ассоциированным опухолям головы и шеи, в настоящее время сохраняется дефицит данных о том, каким образом особенности локального микроокружения участвуют в переходе от доброкачественных и рецидивирующих папилломатозных изменений к злокачественной трансформации эпителия ротоглотки [5, 11]. Недостаточно изучены морфофункциональные взаимосвязи между вирусной персистенцией, состоянием стромально-иммунного компонента, характером макрофагальной реакции, степенью пролиферативной активности и признаками тканевой дезорганизации в зоне малигнизации. Между тем именно выявление таких закономерностей может способствовать уточнению патогенетических механизмов прогрессии, расширению критериев морфологической диагностики и формированию более дифференцированного подхода к стратификации пациентов [11].

Цель исследования – изучение морфофункциональных особенностей иммунного микроокружения слизистой оболочки ротоглотки при папилломах различного ВПЧ-статуса и рецидивирующем течении с использованием иммуногистохимической оценки CD163 и Ki-67.

Материалы и методы

Работа проведена в дизайне проспективного исследования с использованием современных проблемного, интегративного и системного подходов и базировалась на принципах доказательной медицины. Исследование выполнено в период с 2014 по 2025 год на клинической базе Медицинского центра Дальневосточного федерального университета в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации седьмого пересмотра (2013), правилами надлежащей клинической практики и одобрено этической комиссией Дальневосточного федерального университета (протокол № 6 от 19.04.2023).

В исследование включены 92 пациента: 69 пациентов с папилломатозными изменениями слизистой оболочки ротоглотки различной локализации составили основную группу, 23 пациента без морфологических признаков папилломатозного поражения – группу сравнения. Основная группа пациентов с папилломатозными изменениями слизистой ротоглотки была разделена на подгруппы: пациенты с папилломами, не ассоциированными с ВПЧ (n=19); с папилломами, ассоциированными с ВПЧ (n=26); с рецидивирующими папилломами (n=24). Группу сравнения составили 23 наблюдения без морфологических признаков папилломатозного поражения слизистой оболочки ротоглотки. Среди пациентов основной группы были

33 мужчины и 36 женщин в возрасте от 20 до 85 лет, в группе сравнения были 9 мужчин и 14 женщин в возрасте от 26 до 73 лет.

С учетом фактически исследованного материала и поставленных задач в работе анализировались папилломатозные изменения слизистой оболочки ротоглотки, подразделенные на следующие клинико-морфологические подгруппы: папилломы, не ассоциированные с ВПЧ, папилломы, ассоциированные с ВПЧ, рецидивирующие папилломы.

Подгруппа рецидивирующих папиллом была выделена как самостоятельная непересекающаяся группа наблюдений на основании клинически подтвержденного рецидивирующего течения и анализировалась отдельно от подгрупп ВПЧ-ассоциированных и ВПЧ-неассоциированных папиллом. Признаком рецидивирующего течения считали наличие повторного возникновения папилломатозного поражения в ранее леченной анатомической зоне, подтвержденного клинико-морфологически, в течение периода наблюдения.

Критериями включения в основную группу являлись наличие папилломатозного поражения слизистой оболочки ротоглотки, необходимость хирургического лечения папиллом при недостаточной эффективности консервативной терапии либо при ее отсутствии, а также наличие клинических и лабораторных данных, достаточных для морфологической и молекулярно-генетической верификации характера процесса. Для подгруппы ВПЧ-ассоциированных папиллом обязательным критерием было наличие папилломатозного поражения слизистой оболочки ротоглотки при положительном результате исследования полимеразной цепной реакции на ВПЧ с определением генотипа вируса и вирусной нагрузки. В подгруппу ВПЧ-неассоциированных папиллом включались наблюдения с морфологически верифицированным папилломатозным поражением и отрицательным результатом исследования на ВПЧ. Критериями исключения являлись недостаточность клинико-морфологических данных для верификации диагноза, а также состояния, препятствующие выполнению хирургического вмешательства и морфологическому исследованию материала.

Объектом изучения представлены биоптаты слизистой ротоглотки различной локализации, полученные у пациентов с папилломатозными поражениями, нуждавшихся в хирургическом лечении. В спектр материала также входили медицинские документы, анкеты, мазки-отпечатки слизистой оболочки ротоглотки и материал с поверхности слизистой. Морфологическое исследование включало рутинные гистологические методы с окрашиванием препаратов гематоксилином и эозином, а также применение специальных гистохимических методик, в том числе окрашивание Victoria blue. При микроскопическом анализе оценивали особенности гистоархитектоники эпителия и собственной пластинки слизистой оболочки, характер клеточной инфильтрации, выраженность сосудистых изменений, признаки воспаления, папилломатозной перестройки и морфологические признаки неопластической трансформации.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на срезах толщиной 5 мкм, приготовленных из биоптатов слизистой ротоглотки, фиксированных в 10% формалине на фосфатном буфере (pH 6,8–7,2) в течение 24 часов, с последующей стандартной проводкой, заливкой в парафин и нанесением срезов на стекла, предварительно обработанные 0,01% раствором поли-L-лизина (Poly-L-Lysine solution 0,01%, Sigma-Aldrich, США). Иммуноморфологическое окрашивание проводили с использованием высокочувствительных систем EPOS и EnVision (Dako, Дания; Agilent, США) на автоматизированной аппаратуре лаборатории патоморфологии Медицинского университета Ниигаты (Япония). Для выявления CD163 использовали моноклональные антитела клона 10D6 (IgG1, Dako, Дания), для оценки пролиферативной активности – антитела к Ki-67 (клон SP6, Dako, Дания); антитела применяли в разведении 1:50 и 1:100. После стандартного депарафинирования выполняли термическую демаскировку антигенов методом HIAR (heat-induced antigen retrieval, температурное восстановление антигена) в 10 ммоль/л цитратном буфере (pH 6,0) или в растворе Target Retrieval Solution code S1700 (Dako, Дания) на водяной бане при 95–97°C в течение 30–60 минут; часть препаратов дополнительно обрабатывали в микроволновом режиме. Для блокирования эндогенной пероксидазной активности срезы инкубировали в 3% перекиси водорода 5–15 минут, затем после промывания в фосфатном буфере/трис-буферном солевом растворе наносили блокирующий реагент или неиммунную сыворотку для уменьшения неспецифического окрашивания. Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере при 37°C в течение 30–45 минут, далее наносили связывающие антитела и стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена; визуализацию иммунной реакции осуществляли с помощью диаминобензидина, положительную реакцию оценивали по коричневому окрашиванию, после чего препараты докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам. Оценку иммуногистохимической реакции проводили светооптически с анализом распределения, локализации, количества и интенсивности окрашивания иммунопозитивных клеток; подсчет выполняли в 100 полях зрения на срезах, при этом для CD163 учитывали общее количество позитивных клеток/фагоцитов в поле зрения. Фоновое и неспецифическое окрашивание исключали строгим соблюдением условий реакции (температура, pH, время инкубации); в качестве контроля часть препаратов обрабатывали неиммунной сывороткой без нанесения специфических первичных антител.

Для Ki-67 рассчитывали долю позитивных ядер среди не менее чем 100 эпителиальных клеток в анализируемом участке. При неоднородности окрашивания

учитывали зоны максимальной морфологической репрезентативности, исключая участки некроза, грубых артефактов и механического повреждения ткани.

При иммуногистохимическом исследовании оценивались следующие показатели: локализация иммунопозитивных клеток в эпителиальном и стромальном компартментах; количество позитивных клеток в поле зрения; распределение клеточных элементов в ткани; индекс пролиферативной активности Ki-67.

Показатель CD163 в настоящей работе использовался прежде всего как маркер макрофагальной популяции. Основными аналитическими критериями являлись количество CD163+ клеток и их тканевое распределение. Интенсивность окрашивания учитывали только как дополнительный описательный признак иммуногистохимической реакции и не рассматривали в качестве самостоятельного количественного показателя функциональной активности макрофагов.

Оценку Ki-67 проводили путем определения доли иммунопозитивных клеток на 100 клеток в исследуемом поле зрения. Количественный анализ CD163 также выражали как число позитивных клеток в поле зрения. Анализ проводили раздельно для основных групп и контрольных наблюдений с учетом морфологического варианта поражения.

Фазово-контрастную микроскопию мазков, цитологические и дополнительные молекулярно-генетические методы применяли в рамках общего обследования пациентов и расширенного исследовательского протокола; результаты этих методов не являлись предметом самостоятельного количественного анализа в настоящей статье и поэтому не приводятся подробно.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием библиотек языка программирования Python ver. 3.11.9 (Python Software Foundation, США). С учетом ненормального распределения отдельных подгрупп количественные данные представляли в виде медианы и межквартильного интервала (Q25; Q75); дополнительно приводили средние значения и средние квадратичные отклонения (СКО) в описательных целях. Для общего сравнения четырех независимых групп применяли критерий Краскела–Уоллиса. Для анализа связей между количественными и порядковыми признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень статистической значимости принимали равным $p<0,05$.

Результаты

В ходе иммуногистохимического исследования слизистой оболочки ротоглотки были выявлены отчетливые различия в распределении и выраженности реакции на маркер CD163 в группе сравнения и при различных вариантах папилломатозных изменений. Характер локализации иммунопозитивных клеток в исследуемых группах представлен на рисунке 1, где определяются различия клеточного состава и тканевого распределения маркера CD163 в норме и при патологии.

В контрольных наблюдениях CD163+ клетки определялись в ограниченном количестве и характеризовались сравнительно слабой реакцией, что отражало физиологическое состояние локального иммунного микроокружения. При папилломах, не ассоциированных с вирусом папилломы человека, отмечалось значительное увеличение числа CD163+ клеток и усиление интенсивности иммуногистохимической реакции в эпителиальном и субэпителиальном компартментах. При ВПЧ-ассоциированных папилломах реакция на CD163 также сохранялась повышенной при сопоставлении с группой сравнения, однако была менее выраженной, чем при папилломах, не ассоциированных с ВПЧ. При рецидивирующих папилломах наблюдалось сохранение CD163+ клеточного пула на умеренном уровне с признаками менее выраженной иммуногистохимической активности по сравнению с нерецидивирующими ВПЧ-поражениями.

При анализе пролиферативной активности по маркеру Ki-67 установлено, что наибольшая выраженность клеточной пролиферации наблюдалась при ВПЧ-ассоциированных папилломах. Для папиллом, не ассоциированных с ВПЧ, был характерен умеренно повышенный уровень Ki-67 по сравнению с контрольной группой, тогда как рецидивирующие папилломы, напротив, демонстрировали наиболее низкие значения пролиферативной активности среди патологических групп. Наблюдения в группе сравнения занимали промежуточное положение между рецидивирующими и нерецидивирующими формами папилломатозных изменений. Данное распределение может указывать на гетерогенность исследованных поражений по пролиферативной активности и склонности к рецидивированию исследованных поражений и на различную степень вовлеченности механизмов эпителиального обновления в формирование патологического процесса. Диаграммы размахов наглядно демонстрируют межгрупповые различия количественных параметров и подтверждают неодинаковый характер изменений иммунного микроокружения и пролиферативной активности в зависимости от морфологического варианта поражения слизистой оболочки ротоглотки (рис. 2).

Количественный анализ подтвердил наличие статистически значимых межгрупповых различий по возрасту пациентов, уровню реакции на CD163 и показателю пролиферативной активности Ki-67. Сопоставление данных показало, что наиболее высокий уровень реакции с антителами к CD163 был характерен для папиллом, не ассоциированных с ВПЧ, тогда как при ВПЧ-ассоциированных и рецидивирующих папилломах значения данного маркера были ниже, оставаясь при этом выше контрольного уровня. Группа сравнения характеризовалась минимальными значениями CD163, что соответствует отсутствию патологической стимуляции иммунного микроокружения. Полученные данные позволяют предположить, что при папилломатозных изменениях слизистой оболочки

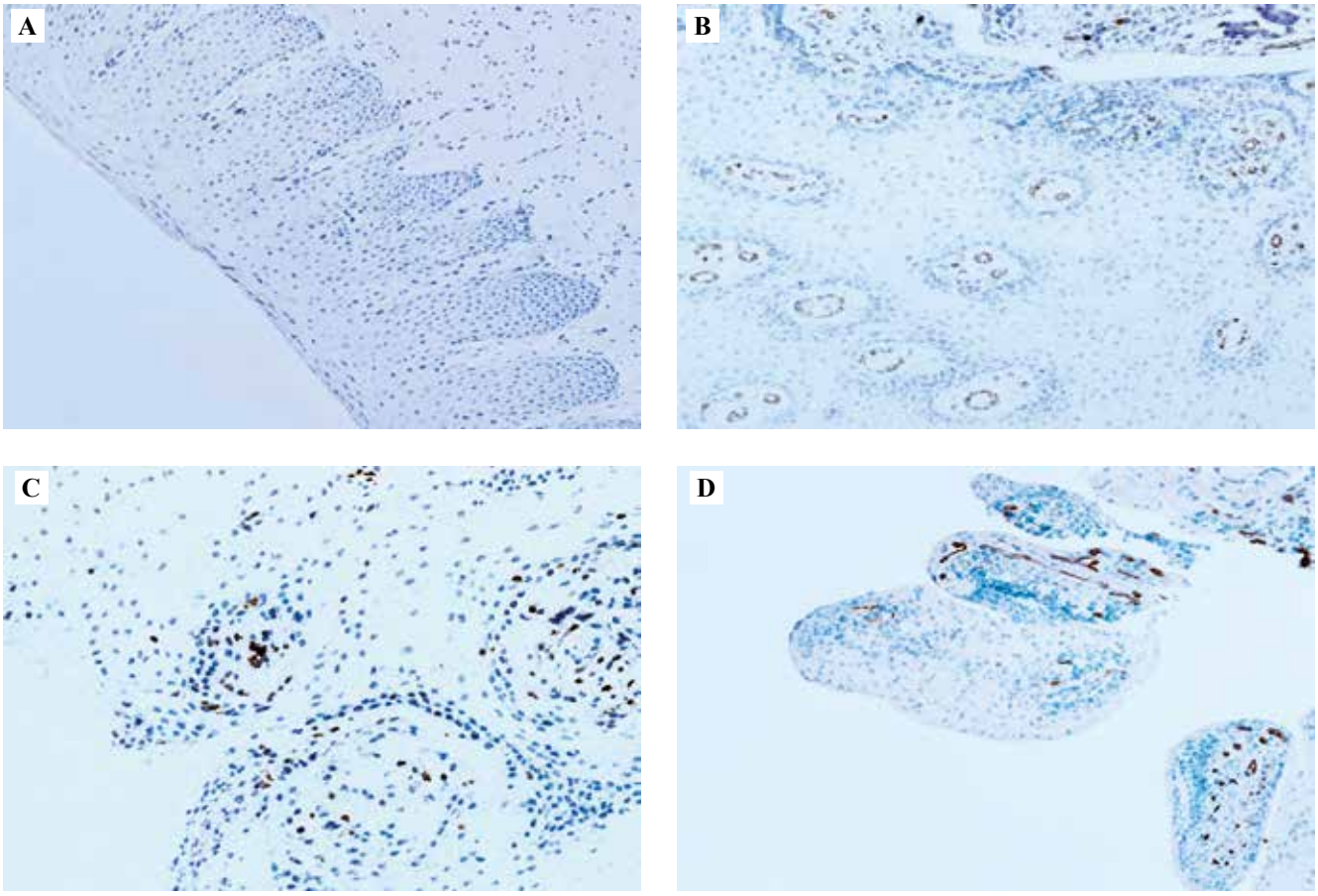


Рис. 1. Изображения иммуногистохимических препаратов для оценки распределения CD163+ клеток в норме и при патологии. A – локализация CD163+ клеток в норме. B – локализация CD163+ клеток эпителия слизистой оболочки ротоглотки при папилломе, не ассоциированной с ВПЧ. C – локализация CD163+ клеток при ВПЧ-ассоциированной папилломе. D – локализация CD163+ клеток эпителия слизистой оболочки ротоглотки при рецидивирующей папилломе. A – ×400, B – ×40, C – ×100, D – ×200

Fig. 1. IHC specimens for assessing the distribution of CD163+ cells in a normal and pathological mucosa. A – localization of CD163+ cells in normal mucosa. B – localization of CD163+ epithelial cells of the oropharyngeal mucosa in HPV-non-associated papilloma. C – localization of CD163+ cells in HPV-associated papilloma. D – localization of CD163+ epithelial cells of the oropharyngeal mucosa in recurrent papilloma. A – ×400, B – ×40, C – ×100, D – ×200

ротоглотки происходит перестройка макрофагального звена иммунного микроокружения, причем характер этой перестройки может различаться в зависимости от ВПЧ-ассоциированности и клинического течения процесса. Сравнительная характеристика возрастных и иммуногистохимических показателей представлена в таблице, где отражены центральные тенденции, вариабельность признаков и статистическая значимость различий между группами.

Корреляционный анализ по Спирмену выявил положительную связь между реакцией на CD163 и уровнем Ki-67, что указывает на возможную сопряженность изменений макрофагального микроокружения с выраженностью пролиферативных процессов в эпителии слизистой оболочки ротоглотки. Установленная корреляция была умеренной, что позволяет рассматривать ее как отражение функционального взаимодействия между клетками иммунного микроокружения и эпителиальным компонентом патологического очага. Связь возраста с количеством клеток CD163 была слабоположительной, тогда как между возрастом и Ki-67 отмечалась слабая отрицательная зависимость. Эти данные позволяют предположить, что возрастной фактор в исследуемой выборке ограниченно влияет на выраженность пролиферативных и иммуноморфологических изменений по сравнению с характером самого патологического процесса. Соответствующие взаимосвязи представлены в матрице корреляций, отражающей направление и силу ассоциаций между возрастом, пролиферативной активностью и фенотипическими характеристиками клеток в слизистой оболочке ротоглотки (рис. 3).

Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что папилломатозные изменения СОР сопровождаются не только усилением про-

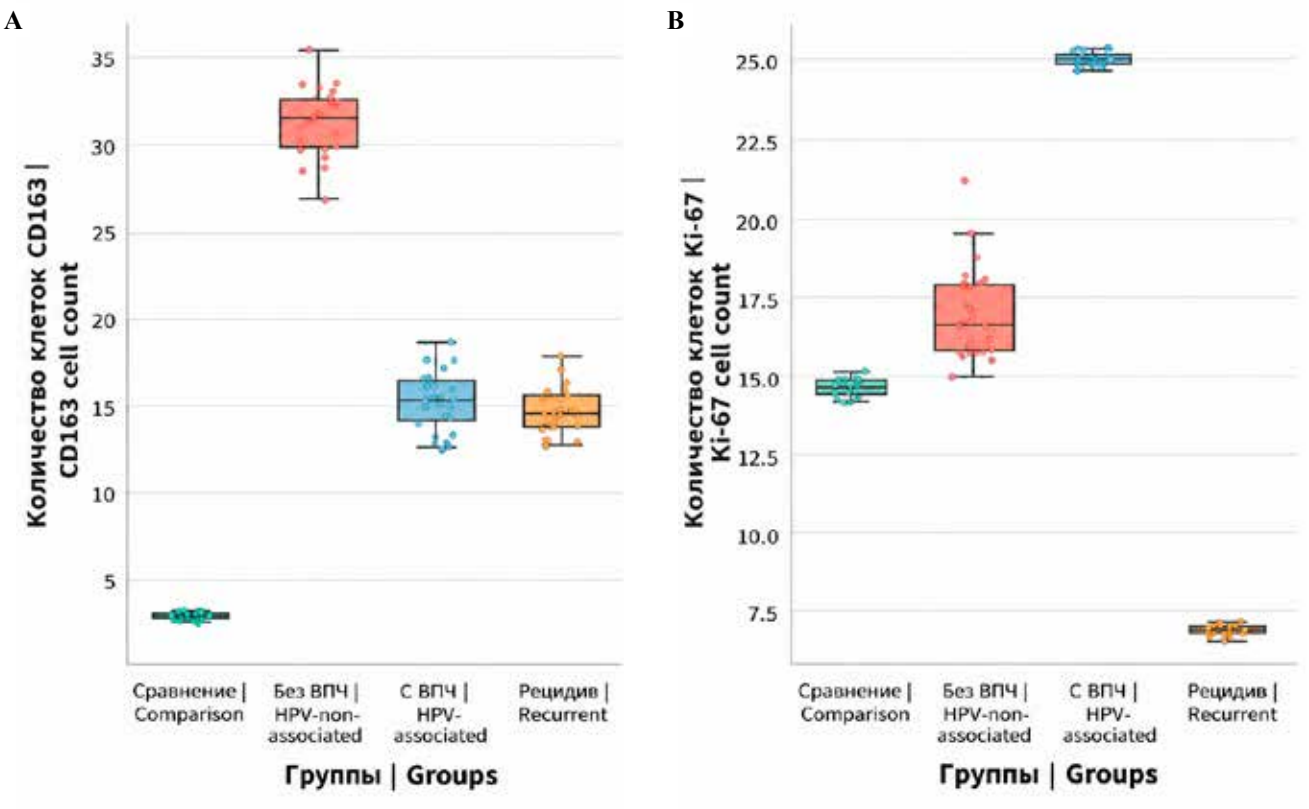


Рис. 2. Диаграммы размахов количества клеток в поле зрения (на 100 клеток) в зависимости от изменений в слизистой оболочке ротоглотки в норме и при различных видах папиллом

Fig. 2. Diagrams of the range of cell counts per 100 cells in normal oropharyngeal mucosa and different types of papillomas

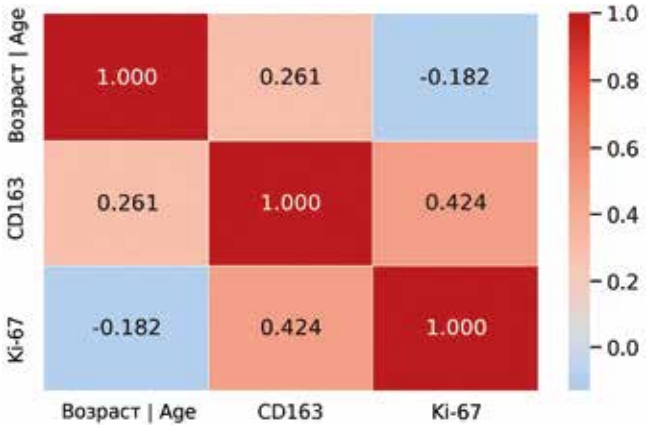


Рис. 3. Матрица корреляции по тесту Спирмена между показателями возраста, пролиферативной активности и фенотипического разнообразия в слизистой оболочке ротоглотки

Fig. 3. Spearman rank correlation for age, proliferative activity, and phenotypic diversity in the pharyngeal mucosa

лиферативной активности эпителия, но и выраженной перестройкой иммунного микроокружения, затрагивающей макрофагальное звено. Установленные различия по количеству клеток CD163 между людьми из группы сравнения и пациентами с ВПЧ-неассоциированными, ВПЧ-ассоциированными и рецидивирующими папилломами позволяют обсуждать папилломатоз ротоглотки не как морфологически однородный процесс, а как спектр состояний с разным соотношением иммунной реактивности и эпителиальной пролиферации.

В современной мировой литературе продемонстрированы результаты того, что заболевания ротоглотки, ассоциированные с вирусом папилломы человека, имеют особую эпидемиологию и биологию [1, 7]. Рост заболеваемости ВПЧ+ орофарингеальным плоскоклеточным раком в последние десятилетия, по данным GLOBOCAN, IARC и ряда крупных обзоров, подтверждает значимость ВПЧ как одного из ведущих факторов патологических изменений в ротоглоточной области [2, 4–7]. При этом большинство исследований сосредоточено на инвазивных карциномах, тогда как доброкачественные и пограничные папилломатозные поражения, особенно в аспекте их иммунного микроокружения, изучены значительно меньше. В этом отношении полученные данные дополняют существующие представления, поскольку демонстрируют, что уже на этапе папилломатозных изменений формируются различные варианты макрофагального ответа, потенциально значимые для дальнейшего течения процесса.

В образцах слизистой оболочки ротоглотки в группе сравнения CD163+ клетки определялись в небольшом количестве и со слабой интенсивностью окрашивания,

Таблица | Table

Сравнительная характеристика возрастных и иммуногистохимических показателей в зависимости от состояния слизистой оболочки ротоглотки в норме и при различных видах папиллом | Comparison of age and IHC parameters across normal and papillomatous oropharyngeal mucosa

Показатель | Marker	Статистический показатель | Statistical indicator	Группа сравнения | Control group	Папилломы, не ассоциированные с ВПЧ | HPV-non-associated papillomas	Папилломы, ассоциированные с ВПЧ | HPV-associated papillomas	Рецидивирующие папилломы | Recurrent papillomas	p-value (тест Краскела–Уоллиса) | p-value (Kruskal–Wallis test)	Значимость | Significance
Возраст | Age	Среднее | Average	32,26	42,96	35,7	45,87	<0,001	+
	СКО | SD	7,2	11,51	12,12	10,97		
	Медиана | Median (Q25; Q75)	32,0 (26,0; 37,0)	46,0 (31,5; 52,0)	40,0 (23,0; 47,0)	45,0 (35,0; 54,0)		
CD163	Среднее | Average	3,4	31,4	15,9	15,4	<0,05	+
	СКО | SD	0,14	2,13	1,67	1,36		
	Медиана | Median (Q25; Q75)	3,41 (3,33; 3,47)	31,74 (29,91; 32,82)	15,88 (14,72; 16,92)	15,13 (14,37; 16,2)		
Ki-67	Среднее | Average	14,7	16,9	24,9	6,7	<0,05	+
	СКО | SD	0,31	1,45	0,21	0,17		
	Медиана | Median (Q25; Q75)	14,68 (14,5; 14,9)	16,56 (15,75; 17,79)	24,91 (24,72; 25,03)	6,72 (6,61; 6,81)		

СКО – среднеквадратичное отклонение | SD – standard deviation

что соответствует физиологическому состоянию тканевых макрофагов в условиях отсутствия выраженной патологической стимуляции. Подобные наблюдения согласуются с общебиологическими представлениями о том, что в нормальной слизистой оболочке макрофаги присутствуют как компонент резидентного иммунного надзора, однако не формируют массивного активированного клеточного пула [11].

В группе папиллом, не ассоциированных с ВПЧ, нами зарегистрированы наиболее высокие показатели CD163. С одной стороны, это может отражать выраженную локальную реакцию иммунного микроокружения на хроническое повреждение, воспаление и тканевую перестройку. С другой стороны, с учетом современной литературы по опухолевой биологии, повышение CD163 обычно трактуется как признак накопления макрофагов М2-подобного профиля, ассоциированных с ремоделированием ткани, ангиогенезом и иммуносупрессивными эффектами. Во многих исследованиях солидных опухолей головы и шеи высокая инфильтрация иммунными клетками коррелировала с неблагоприятными характеристиками микроокружения, однако эти данные преимущественно относятся к инвазивным карциномам [2, 3]. Полученные результаты исследования демонстрируют, что уже в неинвазивных папилломатозных поражениях может формироваться значительный CD163+ пул, что, вероятно, отражает раннюю перестройку местного иммунного контроля.

Вместе с тем простое увеличение числа CD163+ клеток не обязательно эквивалентно полноценной противоопухолевой защите. В ряде современных работ подчеркивается, что макрофагальное микроокружение следует оценивать не только по количеству клеток, но и по их функциональному состоянию и фенотипической направленности [3, 7, 10]. В данном контексте полученные наблюдения, основанные прежде всего на оценке количества и распределения CD163+ клеток, представляются важными. Отмеченные различия в выраженности иммуногистохимической реакции носили дополнительный описательный характер и не использовались как самостоятельный критерий функционального состояния макрофагов. Интенсивное окрашивание CD163 может рассматриваться как косвенный морфофункциональный признак более выраженной активности соответствующего клеточного пула, тогда как снижение интенсивности окрашивания при сохране-

нии клеток в ткани может указывать на изменение их функционального потенциала. Данная трактовка не противоречит современным тенденциям оценки опухолевого микроокружения, где все большее значение придается не только численности иммунных клеток, но и их активационному состоянию.

При ВПЧ-ассоциированных папилломах реакция на CD163 оставалась выше уровня в группе сравнения, однако была существенно ниже, чем при ВПЧ− поражениях. Данный факт представляет интерес в свете данных литературы о способности ВПЧ уклоняться от местного иммунного надзора. Известно, что вирусные белки E6 и E7 нарушают регуляцию клеточного цикла, меняют характер межклеточных взаимодействий и создают условия для иммунного ускользания. Некоторые авторы указывают, что ВПЧ+ поражения ротоглотки характеризуются своеобразным иммунным профилем, включающим сложное сочетание противовирусного ответа, иммунной толерантности и локальной иммуносупрессии [2, 4, 6–8]. В этом отношении снижение уровня CD163 по сравнению с ВПЧ− папилломами может отражать не просто меньшую выраженность воспалительной реакции, а иной тип организации иммунного микроокружения, связанный с вирусной персистенцией и изменением функционального статуса макрофагов.

Стоит отметить, что именно в группе ВПЧ-ассоциированных папиллом была выявлена максимальная пролиферативная активность по Ki-67. Данный аспект хорошо соотносится с фундаментальными представлениями о молекулярной биологии ВПЧ-индуцированных поражений: экспрессия вирусных онкобелков E6 и E7 приводит к инактивации ключевых регуляторов клеточного цикла, включая p53 и pRb-зависимые пути, вследствие чего усиливается вход клеток в пролиферативный цикл. В мировой литературе Ki-67 традиционно рассматривается как один из маркеров интенсивности клеточного обновления и неопластической активности, а для ВПЧ-ассоциированных поражений характерна более выраженная пролиферация эпителиального компонента [3, 8]. Полученные данные согласуются с опубликованными результатами и подтверждают, что ВПЧ-ассоциированные папилломы обладают более активным пролиферативным фенотипом по сравнению с ВПЧ− аналогами.

Интересен факт сочетания в группе пациентов с ВПЧ-ассоциированными папилломами относительно более низкого уровня CD163 по сравнению с группой пациентов с ВПЧ-неассоциированными папилломами и одновременно наиболее высокого Ki-67. Данное соотношение позволяет предположить, что в этих поражениях пролиферативное преимущество эпителия может формироваться на фоне не столько выраженной макрофагальной инфильтрации, сколько качественно изменённого иммунного микроокружения, недостаточно ограничивающего вирус-индуцированное клеточное обновление. Подобная интерпретация согласуется с данными литературы о том, что ВПЧ-ассоциированные процессы могут демонстрировать высокую биологическую активность эпителия даже при отсутствии грубого воспалительного ответа [2, 6, 10].

Рецидивирующие папилломы в исследовании характеризовались умеренным уровнем CD163 и минимальными значениями Ki-67 среди патологических групп. На первый взгляд такой профиль может показаться парадоксальным, поскольку рецидив обычно ассоциируется с агрессивностью процесса. Тем не менее в мировой литературе неоднократно подчеркивается, что рецидивирование не всегда определяется исключительно высокой текущей пролиферацией. Оно может быть связано с сохранением патологического клеточного клона, неполной элиминацией измененной ткани, особенностями локального микроокружения, нарушением иммунного контроля и повторной активацией остаточных очагов. Следовательно, низкий Ki-67 при рецидивирующих папилломах может отражать не отсутствие биологического потенциала, а иной режим существования патологического очага – более «персистирующий», чем активно экспансивный. Умеренная, но не высокая реакция на CD163 в этой группе также может свидетельствовать о неполноценной или истощенной перестройке макрофагального звена, недостаточной для полноценного контроля над очагом.

С данных позиций полученные результаты представляют интерес и в более широком патогенетическом контексте. В ряде современных исследований по опухолям головы и шеи подчеркивается, что наличие иммунных клеток в ткани не всегда означает сохранность их эффекторных свойств [1–3, 6]. Напротив, опухолевое или предопухолевое микроокружение способно переводить макрофаги в фенотип, поддерживающий хроническое воспаление, ремоделирование матрикса и толерантность к патологически измененному эпителию. Поэтому для интерпретации CD163 важно учитывать прежде всего количество и распределение позитивных клеток в ткани, тогда как особенности окрашивания могут иметь лишь вспомогательное описательное значение. В настоящем исследовании особенности окрашивания учитывались только как дополнительный морфологический признак и не служили основанием для прямых выводов о функциональном состоянии клеточного пула.

Выявленная положительная корреляция между CD163 и Ki-67 заслуживает отдельного обсуждения. В мировой литературе связь между макрофагальным микроокружением и пролиферативной активностью эпителия описана для многих солидных опухолей, включая новообразования головы и шеи [2, 3, 6]. Макрофаги через секрецию цитокинов, факторов роста и протеаз способны влиять на пролиферацию, дифференцировку и ремоделирование ткани. Полученная умеренная положительная корреляция подтверждает наличие сопряженности между состоянием макрофагального звена и интенсивностью эпителиального обновления. При этом умеренная, а не сильная величина коэффициента указывает, что пролиферация

определяется не только макрофагальным компонентом, но и рядом других факторов – в частности, вирусной нагрузкой, молекулярными нарушениями клеточного цикла, характером стромально-эпителиальных взаимодействий и клиническими особенностями процесса.

Обнаруженные возрастные различия также в целом не противоречат данным литературы. Хотя ВПЧ-ассоциированные поражения ротоглотки нередко описываются у более молодых пациентов по сравнению с классическими ВПЧ− вариантами злокачественных опухолей, в пределах папилломатозных изменений возрастной фактор, по-видимому, играет менее определяющую роль, чем биология самого очага. Выявленные слабые корреляции возраста с CD163 и Ki-67 подтверждают, что возраст в данной выборке не был главным детерминантом морфофункциональных изменений, тогда как решающее значение имели ВПЧ-статус и характер клинического течения.

Следует отметить, что полученные данные вписываются в современную концепцию гетерогенности заболеваний ротоглотки, согласно которой ВПЧ+ и ВПЧ− процессы различаются не только по этиологии, но и по молекулярному профилю, иммунному ландшафту и клиническому поведению. Если в большинстве опубликованных работ основной акцент сделан на различиях между ВПЧ+ и ВПЧ− орофарингеальным раком, то в настоящем исследовании показано, что подобная гетерогенность прослеживается уже на уровне папилломатозных изменений. Это имеет практическое значение, поскольку указывает на перспективность более ранней стратификации очагов по признакам пролиферативной активности и состояния иммунного микроокружения.

В то же время результаты исследования позволяют поставить вопрос о морфофункциональной несводимости количества иммунных клеток к их реальной биологической роли. Наличие значительного пула CD163+ клеток в ВПЧ− папилломах и более низкие значения данного маркера при ВПЧ-ассоциированных поражениях с высокой пролиферацией показывают, что количественная оценка без учета интенсивности сигнала и клинико-морфологического контекста может быть недостаточной. В этом отношении иммуногистохимическая оценка должна интерпретироваться комплексно – с учетом локализации клеток, силы экспрессии, сочетания с Ki-67 и характера течения процесса.

С практической точки зрения полученные данные подтверждают перспективность использования CD163 и Ki-67 как взаимодополняющих маркеров при морфологической оценке папиллом ротоглотки. Ki-67 отражает пролиферативный потенциал эпителиального компонента, тогда как CD163 характеризует особенности макрофагального микроокружения. Их совместный анализ может способствовать более точной морфологической характеристике биологических особенностей поражения и рассматриваться как основание для дальнейших исследований прогностической значимости этих маркеров. Однако на основании настоящего исследования делать окончательные выводы о возможности выделения групп повышенного риска и выборе персонализированной тактики наблюдения преждевременно.

Ограничением исследования является то, что интерпретация CD163 как показателя функционального состояния макрофагов основывается на иммуногистохимической визуализации и полуколичественной оценке окрашивания, тогда как окончательная верификация функционального фенотипа требует расширения панели маркеров и, по возможности, молекулярных методов анализа. Кроме того, сопоставление с мировой литературой затрудняется тем, что большинство зарубежных работ посвящено инвазивным карциномам СОР, а не папилломатозным изменениям слизистой оболочки ротоглотки. Тем не менее именно это обстоятельство подчеркивает новизну настоящего исследования и его значение для расширения представлений о ранних этапах патологической перестройки тканей ротоглоточной области.

Дополнительное ограничение – отсутствие анализа отдаленных клинических исходов, что не позволяет в рамках настоящей работы определить прогностическую эффективность сочетанной оценки CD163 и Ki-67. Кроме того, группа рецидивирующих папиллом требует дальнейшей стратификации с учетом ВПЧ-статуса и клинических особенностей течения.

Заключение

Проведенное исследование демонстрирует, что папилломатозные изменения слизистой оболочки ротоглотки сопровождаются выраженной гетерогенностью как макрофагального иммунного микроокружения, так и пролиферативной активности эпителия. Установлено, что наиболее высокий уровень реакции на CD163 характерен для папиллом, не ассоциированных с ВПЧ, тогда как ВПЧ-ассоциированные поражения отличаются максимальными значениями Ki-67, что отражает преобладание пролиферативного компонента в их биологическом поведении. Рецидивирующие папилломы характеризуются умеренной реакцией на CD163 и низкой пролиферативной активностью, что позволяет предполагать особый, вероятно персистирующий, вариант течения патологического процесса. Выявленная положительная корреляция между CD163 и Ki-67 подтверждает взаимосвязь между перестройкой иммунного микроокружения и эпителиальным обновлением. Полученные результаты обосновывают целесообразность комплексной морфологической оценки маркеров CD163 и Ki-67 для более точной характеристики папиллом слизистой оболочки ротоглотки и уточнения их патогенетических особенностей. Вместе с тем выводы о прогностической ценности данной комбинации маркеров, возможностях выделения групп повышенного риска, определения зоны потенциальной малигнизации и выбора персонализированной тактики наблюдения требуют дальнейших проспективных исследований с анализом клинических исходов.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – Г.В. Рева, С.В. Иченко, Б.О. Щеглов.
Сбор и обработка материала – С.В. Иченко, И.В. Рева, А.Р. Ким, А.С. Золотов, Ю.А. Красников, Ю.И. Гайнуллина, С.Н. Щеглова.
Написание текста – Б.О. Щеглов, С.В. Иченко.
Редактирование – Г.В. Рева.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – G.V. Reva, S.V. Ichenko, B.O. Shcheglov.
Collected the data and performed the analysis – S.V. Ichenko, I.V. Reva, A.R. Kim, A.S. Zolotov, Yu.A. Krasnikov, Yu.I. Gainullina, S.N. Shcheglova.
Wrote the paper – B.O. Shcheglov, S.V. Ichenko.
Edited the manuscript – G.V. Reva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Migliaro M, Massuh D, Infante MF, Brahm AM, San Martín MT, Ortuño D.* Role of Epstein-Barr virus and human papilloma virus in the development of oropharyngeal cancer: a literature review. Int J Dent. 2022;2022:3191569. DOI: 10.1155/2022/3191569.
2. *Yan Q, Chen P, Chen X, Chen G, Luo L, Ruan P et al.* Expression of CK7, CK19 and p16 in HPV-mediated oropharyngeal squamous cell carcinoma. PeerJ. 2024;12:e18286. DOI: 10.7717/peerj.18286.
3. *Zhou B, Li D, Chen X, Cai F, Cui J, Liu S et al*. Transformation zone at the vallate papillae: a significant source of papillomavirus infection at the base of the tongue? J Cancer Res Clin Oncol. 2024;150(11):492. DOI: 10.1007/s00432-024-06016-6.
4. *Katabathina VS, Ghannam S, Chen M, Desalme B, Gabos R, Emejulu I et al*. Update on pathologic conditions, imaging findings, prevention, and management of human papillomavirus-related neoplasms. Radiographics. 2024;44(8):e230179. DOI: 10.1148/rg.230179.
5. *Tan CX, Yeo SW, Wong YP, Tan GC*. Globus pharyngeus due to a lymphangiomatous polyp arising from the tonsil. Malays J Pathol. 2023;45(2):271–3. PMID: 37658536.
6. *Luna AJ, Young JM, Sterk RT, Bondu V, Schultz FA, Kusewitt DF et al*. Inhibition of cellular MEK/ERK signaling suppresses murine papillomavirus type 1 replicative activities and promotes tumor regression. bioRxiv [Preprint]. 2023.03.14.532042. DOI: 10.1101/2023.03.14.532042.
7. *Andrei EC, Baniţă IM, Munteanu MC, Busuioc CJ, Mateescu GO, Mălin RD et al*. Oral papillomatosis: its relation with human papillomavirus infection and local immunity – an update. Medicina (Kaunas). 2022;58(8):1103. DOI: 10.3390/medicina58081103.
8. *Shigeishi H*. Association between human papillomavirus and oral cancer: a literature review. Int J Clin Oncol. 2023;28(8):982–9. DOI: 10.1007/s10147-023-02327-9.
9. *Roza ALOC, Fonsêca TC, Mariz BALA, Penafort PVM, Martínez-Flores R, Marshall-Baburizza M et al*. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia: report of 5 illustrative cases from Latin America. Head Neck Pathol. 2023;17(4):921–31. DOI: 10.1007/s12105-023-01589-z.
10. *Urias-Barreras CM, Rendón-Maldonado JG, Villalobos-Rodelo JJ, Ramón-Gallegos E, Rodríguez-Archilla A*. Benign HPV-associated oral, oropharyngeal and sinonasal lesions in anatomical and oral pathology laboratories in Mexico. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2026;127(5):102827. DOI: 10.1016/j.jormas.2026.102827.
11. *Reva I, Stegniy K, Dvoinikova E, Mozhilevskaya E, Fleischman M, Ichenko S et al*. The role of CD34-positive cells in the angiogenesis of malignant tissues. Arch EuroMedica. 2022;12(1):8–10. DOI: 10.35630/2199-885X/2022/12/1.2.

Информация об авторах

Богдан Олегович Щеглов – кандидат медицинских наук, медицинский аналитик данных Медицинского комплекса, ассистент департамента фундаментальной медицины Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Станислав Владимирович Иченко – кандидат медицинских наук, руководитель Центра отоларингологии и челюстно-лицевой хирургии, врач отоларинголог-хирург, доцент департамента клинической медицины Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Иван Владимирович Рева – доктор медицинских наук, профессор департамента фундаментальной медицины Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Александр Сергеевич Золотов – доктор медицинских наук, врач-травматолог, профессор департамента клинической медицины Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Юрий Александрович Красников – доктор медицинских наук, профессор кафедры теории и методики адаптивной физической культуры Дальневосточного федерального университета.

Светлана Николаевна Щеглова – кандидат педагогических наук, доцент кафедры педагогических наук Северо-восточного государственного университета.

Александр Русланович Ким – врач стоматолог-ортопед ООО «ДЕНТАЛЛЮКС СЕРВИС».

Юлия Игоревна Гайнуллина – доктор медицинских наук, профессор кафедры медико-биологических дисциплин Владивостокского государственного университета.

Галина Витальевна Рева – доктор медицинских наук, профессор, профессор департамента фундаментальной медицины Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Author information

Bogdan O. Shcheglov – Cand. Sci. (Med.), Medical Analytics of Medical Complex, Assistant, Department of Fundamental Medicine, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.
http://orcid.org/0000-0002-2262-1831

Stanislav V. Ichenko – Cand. Sci. (Med.), Head of the Center for Otolaryngology and Maxillofacial Surgery, Otolaryngologist-Surgeon, Associate Professor, Department of Clinical Medicine, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.
http://orcid.org/0000-0001-5260-0954

Ivan V. Reva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Fundamental Medicine, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.
http://orcid.org/0000-0002-3727-393X

Alexander S. Zolotov – Dr. Sci. (Med.), Traumatologist, Professor, Department of Clinical Medicine, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.
http://orcid.org/0000-0002-0045-9319

Yuriy A. Krasnikov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Theory and Methodology of Adaptive Physical Culture, Far Eastern Federal University.
https://orcid.org/0000-0002-0388-1777

Svetlana N. Shcheglova – Cand. Sci. (Ped.), Associate Professor, Department of Pedagogical Sciences, North-Eastern State University.
http://orcid.org/0000-0001-5898-9120

Alexander R. Kim – Dentist-Orthopedist, LLC “DENTALLUX SERVICE”.
http://orcid.org/0009-0006-2911-9883

Yulia I. Gaynullina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Biomedical Sciences, Vladivostok State University.
https://orcid.org/0000-0003-2694-3712

Galina V. Reva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Department of Fundamental Medicine, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University.
http://orcid.org/0000-0001-6502-4271

© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44 УДК: 616.74-007.17:611.018

Гистоморфометрическое исследование мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J при системной терапии посредством AAB9.ДИСФ.ДВ

И.А. Яковлев[1], И. Сорочану[1,2], А.М. Емелин[2], Н.С. Гладышев[2], И.С. Лимаев[2], Д.В. Вдовина[2], Ю.А. Ветрова[3], А.А. Исаев[4], Р.В. Деев[2,4]

[1] ООО «Генотаргет», Инновационный центр «Сколково», Москва, Россия
[2] ГНЦ РФ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия
[3] ООО «Медицинский институт имени Березина Сергея», Санкт-Петербург, Россия
[4] ПАО «Артген биотех», Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Дисферлинопатия представляет собой группу тяжелых мышечных дистрофий, для которых в настоящее время не существует одобренной этиопатогенетической терапии. Использование рекомбинантных аденоассоциированных вирусов ограничено малым размером вирусного капсида, не вмещающим полноразмерный ген *DYSF*. Целью работы стало гистоморфометрическое исследование скелетной мышечной ткани после системного введения оригинальной двухвекторной перекрывающейся системы на основе аденоассоциированных вирусов на модели дисферлинопатии.
Материалы и методы. В исследовании *in vivo* взрослым самцам мышей линии Bla/J (возраст 7 месяцев) однократно внутривенно вводили препарат AAB9.ДИСФ.ДВ в дозе 5×10^{12} вг/кг (n=14). В качестве групп сравнения были включены группы отрицательного (самцы линии Bla/J, n=10) и положительного (интактные самцы линии C57BL/6J, n=10) контроля, которым было выполнено введение физиологического раствора. Через 3 месяца и 6 месяцев скелетные мышцы задних конечностей – икроножную, переднюю большеберцовую и латеральную широкую мышцу бедра (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) – оценивали методами иммунофлуоресценции и гистоморфометрии.
Результаты. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил сборку и восстановление синтеза белка дисферлина *in vivo* во всех изученных мышцах. На сроке 3 месяца зафиксирован выраженный гистопротекторный эффект: тенденция к снижению доли некротизированных волокон по сравнению с отрицательным контролем, а также достоверное увеличение площади поперечного сечения волокон в *m. gastrocnemius* (p=0,012) и *m. tibialis anterior* (p=0,015). К 6-му месяцу зарегистрирован возврат показателей к уровню отрицательного дистрофического контроля, обусловленный эписомальной дилюцией вектора на фоне непрерывных циклов дегенерации и регенерации мышечной ткани. Тем не менее системное введение вектора обеспечило устойчивую стабилизацию в *m. gastrocnemius*, предотвратив нарастание доли волокон с интернализированными ядрами (p=0,572 в экспериментальной группе по сравнению со значимым ухудшением отрицательного контроля, p=0,032).
Заключение. Системное применение разработанной двухвекторной конструкции AAB9.ДИСФ.ДВ обеспечивает стабильный во времени синтез дисферлина и оказывает гистопротекторное действие, ослабевающее к 6 месяцам. Полученные данные свидетельствуют о работоспособности конструкции при системной доставке и указывают на необходимость ее оптимизации для удержания достигнутого эффекта.

Ключевые слова: дисферлинопатия, генная терапия, поясно-конечностная мышечная дистрофия типа R2, аденоассоциированный вирус (AAB), двухвекторная система, Bla/J, гистоморфометрия

Для корреспонденции: Ирина Сорочану. E-mail: ipsorochanu@gmail.com

Для цитирования: Яковлев И.А., Сорочану И., Емелин А.М., Гладышев Н.С., Лимаев И.С., Вдовина Д.В., Ветрова Ю.А., Исаев А.А., Деев Р.В. Гистоморфометрическое исследование мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J при системной терапии AAB9.ДИСФ.ДВ. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):30–44. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания (№ 125021201974-2) «Генно-клеточная регуляция регенерации тканей опорно-двигательного аппарата и разработка лекарственных препаратов на их основе».

Статья поступила 15.06.2026. **Получена после рецензирования** 23.06.2026. **Принята в печать** 05.10.2026.

Histomorphometric analysis of muscle tissue in dysferlin-deficient Bla/J mice following systemic AAV9.DYSF.DV therapy

I.A. Yakovlev[1], I. Sorochanu[1,2], A.M. Emelin[2], N.S. Gladyshev[2], I.S. Limaev[2], D.V. Vdovina[2], Iu.A. Vetrova[3], A.A. Isaev[4], R.V. Deev[2,4]

[1] LLC Genotarget, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia
[2] Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia
[3] LLC Oncologic Clinic MIBS, Saint Petersburg, Russia
[4] PJSC Artgen Biotech, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Dysferlinopathy is a group of severe muscular dystrophies for which there is no approved etiopathogenetic therapy. The use of recombinant adeno-associated viruses (AAV) is limited by the small packaging capacity of the viral capsid, which cannot accommodate the full-length *DYSF* gene. The aim of this study was to conduct a histomorphometric evaluation of skeletal muscle tissue following the systemic administration of an original dual-vector overlapping AAV-based system in a model of dysferlinopathy.
Materials and methods. Adult male Bla/J mice (7 months of age, n=14) received a single intravenous injection of AAV9.DYSF.DV at a dose of 5×10^{12} vg/kg (n=14). A negative control (male Bla/J mice, n=10) and a positive control (male C57BL/6J mice, n=10), which were administered physiological saline, were comparison groups. At 3 and 6 months post-injection, the hindlimb skeletal muscles (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, and *m. vastus lateralis*) were examined using immunofluorescence and histomorphometry.
Results. Immunofluorescence analysis confirmed the reconstitution and restored synthesis of full-length dysferlin *in vivo*. At 3 months, we noted a pronounced histoprotective effect evidenced by a decreasing percentage of necrotic fibers compared to negative controls and a statistically significant increase in muscle fiber cross-sectional area in *m. gastrocnemius* (p=0.012) and *m. tibialis anterior* (p=0.015). By month 6, morphometric parameters returned to the baseline dystrophic level, which was driven by episomal vector dilution during chronic muscle tissue cellular turnover. Nevertheless, systemic administration of the vector provided stable structural preservation in *m. gastrocnemius*, preventing the progression of nuclear internalization in the treated group (p=0.572) compared to a significant progression in untreated mice (p=0.032).
Conclusion. Systemic administration of the developed dual-vector construct AAV9.DYSF.DV ensures a time-stable synthesis of dysferlin and exerts a histoprotective effect that wanes by 6 months. The obtained data demonstrate the viability of the construct upon systemic delivery and indicate the need for its optimization to sustain the achieved effect.

Keywords: dysferlinopathy, gene therapy, limb-girdle muscular dystrophy type R2 (LGMDR2), adeno-associated virus (AAV), dual-vector system, Bla/J, histomorphometry

Corresponding author: Irina Sorochanu. E-mail: ipsorochanu@gmail.com

For citation: Yakovlev I.A., Sorochanu I., Emelin A.M., Gladyshev N.S., Limaev I.S., Vdovina D.V., Vetrova Iu.A., Isaev A.A., Deev R.V. Histomorphometric analysis of muscle tissue in dysferlin-deficient Bla/J mice following systemic AAV9.DYSF.DV therapy. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):30–44 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment (No. 125021201974-2) “Gene-cell regulation of tissue regeneration in the musculoskeletal system and the development of pharmaceuticals based on it.”

Received 15.06.2026. **Received in revised form** 23.06.2026. **Accepted** 05.10.2026.

Введение

Дисферлинопатия представляет собой фенотипически гетерогенную группу прогрессирующих мышечных дистрофий, развитие которых обусловлено патогенными вариантами в гене *DYSF*, кодирующем белок дисферлин [1, 2]. Выделяют два наиболее часто встречающихся фенотипа – поясно-конечностную мышечную дистрофию типа R2 и миопатию Миоши [2–4], распространенность которых составляет от 1:1300 до 1:2 000 000 человек [2, 5]. Основным экспериментальным подходом лечения, как и для ряда других моногенных заболеваний, является заместительная генная терапия с использованием рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ). Она заключается в доставке в мышечную ткань функциональной копии терапевтического гена, на матрице которого в дальнейшем синтезируется целевой белок [6, 7].

Применение такого подхода для дисферлинопатии сопряжено с технологическими трудностями из-за размера кодирующей последовательности (кДНК) гена *DYSF* (от 6,2 до 6,5 т.п.н.) [8], существенно превышающей упаковочную емкость стандартного капсида ААВ (~4,7 т.п.н.) [9]. Для преодоления этого ограничения коллективом авторов ранее была разработана ориги-

нальная двухвекторная генно-терапевтическая конструкция на основе AAB, предполагающая раздельную доставку фрагментов целевого гена с их последующей внутриклеточной сборкой в единую и полноразмерную функциональную молекулу (заявка на патент РФ № 2025121570). Несмотря на успешное применение разработанной конструкции при локальном (внутримышечном) введении [10], важнейшим условием для потенциальной клинической трансляции препарата является доказательство его долгосрочной эффективности при системном (внутривенном) методе введения, способном обеспечить терапевтический охват всей скелетной мускулатуры организма [11].

В связи с этим целью настоящего исследования стала морфологическая оценка среднесрочного терапевтического действия (3 месяца и 6 месяцев) однократного системного введения оригинальной двухвекторной конструкции на основе AAB в модели дисферлинопатии – мышей линии BlaJ, базовый дистрофический фенотип которых на момент введения был охарактеризован ранее [12].

Материалы и методы

Векторная генно-терапевтическая конструкция

В работе использовалась оригинальная двухвекторная конструкция на основе AAB, кодирующая ген дисферлина человека, – AAB9.ДИСФ.ДВ. Высокая степень эволюционной консервативности дисферлина человека и мыши (идентичность аминокислотной последовательности 89,6%) обусловливает функциональную состоятельность использования человеческого трансгена в модели заболевания на мышах. Детальное описание дизайна плазмиды, схемы наработки вектора и его предварительная *in vitro* и *in vivo* характеристики описаны ранее [10].

Дизайн эксперимента и лабораторные животные

В исследовании использовались самцы мышей линии Bla/J (B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ) в возрасте 7 месяцев, несущих мутацию гена *DYSF* и служивших моделью дисферлинопатии. Мутация представляет собой инсерцию ретротранспозона в интрон 4, приводящую к аберрантному сплайсингу пре-мРНК и последующему полному блокированию синтеза белка. Животные содержались в виварии с контролируемыми условиями среды, 12-часовым циклом освещения, при температуре 22±2°C и доступом к корму и воде *ad libitum*.

Все этапы экспериментального исследования полностью соответствовали законодательству Российской Федерации (включая Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации»), нормативным документам исследовательских организаций, а также были одобрены биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 15/10 от 29.10.2021).

Мыши были рандомизированы на три экспериментальные группы:

- экспериментальная терапевтическая группа с внутривенным введением в хвостовую вену исследуемого препарата в дозе 5×10^{12} векторных геномов на 1 кг веса животного (вг/кг) в объеме 150 мкл (n=14);
- отрицательная контрольная группа (нелеченые мыши BlaJ) с внутривенным введением эквивалентного объема физиологического раствора (n=10);
- положительная контрольная группа (генетически интактные мыши дикого типа исходной линии C57Bl/6J) с аналогичным введением физиологического раствора (n=10).

Системное внутривенное введение препарата и физиологического раствора проходило без общей анестезии с использованием индивидуальных фиксирующих устройств – рестрейнеров.

В дальнейшем проводилось исследование в двух временны́х точках: через 3 месяца и 6 месяцев после введения. Для этого в указанные сроки из эксперимента выводилась ровно половина животных из каждой когорты. Выведение животных из эксперимента осуществляли методом цервикальной дислокации шейных позвонков, после чего проводили выделение скелетных мышц задних конечностей икроножной, передней большеберцовой и латеральной широкой мышцы бедра (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) для дальнейшего анализа.

Иммунофлуоресценция

Для иммунофлуоресцентного исследования извлеченные скелетные мышцы задних конечностей (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) подвергали быстрой заморозке в изопентане, предварительно охлажденном в жидком азоте. Из полученных криоблоков изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм с помощью криостата CryoStar NX50 (Epredia, Германия). В дальнейшем на криосрезах проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием первичных кроличьих моноклональных антител к дисферлину (клон JAI-1-49-3, № ab124684, Abcam, Великобритания, 1:200) и соответствующих вторичных козьих антикроличьих антител, конъюгированных с красителем Alexa Fluor 555 (№ ab150078, Abcam, Великобритания, 1:200). Ядра клеток докрашивали красителем DAPI (№ D1306, Invitrogen, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 10 минут. С целью количественной оценки трансдукции была посчитана доля дисферлин-позитивных волокон (%).

Гистологическое исследование и морфометрия

Для проведения рутинного гистологического исследования аналогичные целевые скелетные мышцы (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) фиксировали в 10% нейтральном забуференном форма-

лине. Затем материал проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм с помощью ротационного микротома MT1 (Dakewe, КНР).

Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином с дальнейшим получением изображений с использованием сканера гистологических препаратов KF-PRO-120 (KFBio, КНР). Гистотопограммы мышечных срезов анализировали с использованием программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica Biosystems, США) для проведения морфометрической оценки следующих гистологических параметров:

- доля некротизированных мышечных волокон (МВ) (%);
- доля мышечных волокон с интернализированными ядрами (%);
- площади поперечного сечения мышечных волокон (мкм^2).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка статистического программирования R (версия 4.3.3, R Core Team, Австрия) в интегрированной среде разработки RStudio (версия 2023.12.1, Posit Software, PBC, США). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения и 95% доверительного интервала (95% ДИ). Статистическая значимость межгрупповых различий (p-value) оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с последующей поправкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга.

Результаты

Восстановление синтеза белка дисферлина

По результатам иммунофлуоресценции у мышей с дисферлинопатией, получивших однократную внутривенную инъекцию исследуемого AAB-препарата, было выявлено восстановление синтеза целевого белка во всех проанализированных скелетных мышцах. Локализация синтезируемого *de novo* дисферлина продемонстрировала смешанный паттерн распределения. Наряду с участками мембранного флуоресцентного окрашивания, подтверждающими встраивание белка в сарколемму мышечных волокон, в ткани регистрировался выраженный внутриклеточный (цитоплазматический) сигнал, а также образование субсарколеммальных агрегатов (рис. 1 A, B).

В то же время в группе отрицательного контроля (мыши Bla/J, получавшие инъекцию плацебо в виде физиологического раствора) специфический сигнал дисферлина полностью отсутствовал как через 3 месяца, так и через 6 месяцев эксперимента (рис. 1 C). В свою очередь, описанный паттерн отличался от профиля естественного распределения в группе положительного контроля – у интактных мышей дикого типа C57Bl/6J наблюдалась локализация дисферлина равномерно по контурам мембран всех волокон, без цитоплазматического свечения (рис. 1 D).

При подсчете доли дисферлин-позитивных волокон через 3 месяца после однократной системной инъекции среднее значение составило 3,80% (95% ДИ: 0,00–8,77%). К 6-му месяцу эксперимента показатели трансдукции стабилизировались, а среднее значение доли позитивных волокон достигло 4,97% (95% ДИ: 0,44–9,56%). Статистическое сравнение двух временны́х точек подтвердило отсутствие значимых различий в количестве трансдуцированных волокон между 3-м и 6-м месяцами наблюдения (p=0,749).

Гистоморфометрическая характеристика скелетных мышц

При качественном исследовании скелетных мышц через 3 месяца после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ в группе терапии визуализировалось изменение гистологической структуры ткани, которое выражалось в снижении количества дегенерирующих волокон и выраженности воспалительной инфильтрации. Кроме того, в *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* отмечалось увеличение поперечного размера МВ с формированием крупных однородных полей, что визуально приближало ткань к характеристике мышечных волокон мышей C57Bl/6J. К сроку 6 месяцев общая архитектоника ткани оставалась более сохранной, чем у особей из отрицательной контрольной группы, а в обеих временны́х точках визуально определялось присутствие выраженного количества волокон с интернализированными ядрами. Тем не менее в отдельных полях зрения обнаруживались очаги некрозов и воспалительной инфильтрации, нехарактерные для сохранной ткани, но менее выраженные, чем в отрицательной контрольной группе (рис. 2).

При определении доли некротизированных волокон через 3 месяца после терапии в экспериментальной группе животных выраженность дегенеративных процессов варьировала. В *m. gastrocnemius* значимые различия между опытной и отрицательной контрольными группами не выявлены (средние 1,35 и 1,88%, соответственно, p=0,682) (рис. 3 A). В *m. tibialis anterior* среднее значение доли некротизированных волокон составило 1,35% (95% ДИ: 0,44–2,26%), что было ниже показателей группы мышей Bla/J без лечения, где среднее достигало 5,56% (95% ДИ: 0,12–11,24%) (p=0,163) (рис. 3 B).

В *m. vastus lateralis* на этом же сроке у животных после терапии AAB среднее значение доли некротизированных волокон составило 3,28% (95% ДИ: 1,11–5,44%), демонстрировало тенденцию к снижению по сравнению с группой отрицательного контроля – 7,86% (95% ДИ: 2,74–12,97) (p=0,067) (рис. 3 C).

В 6 месяцев статистически значимые различия по доле некротизированных МВ также не были обнаружены (рис. 3 A–C).

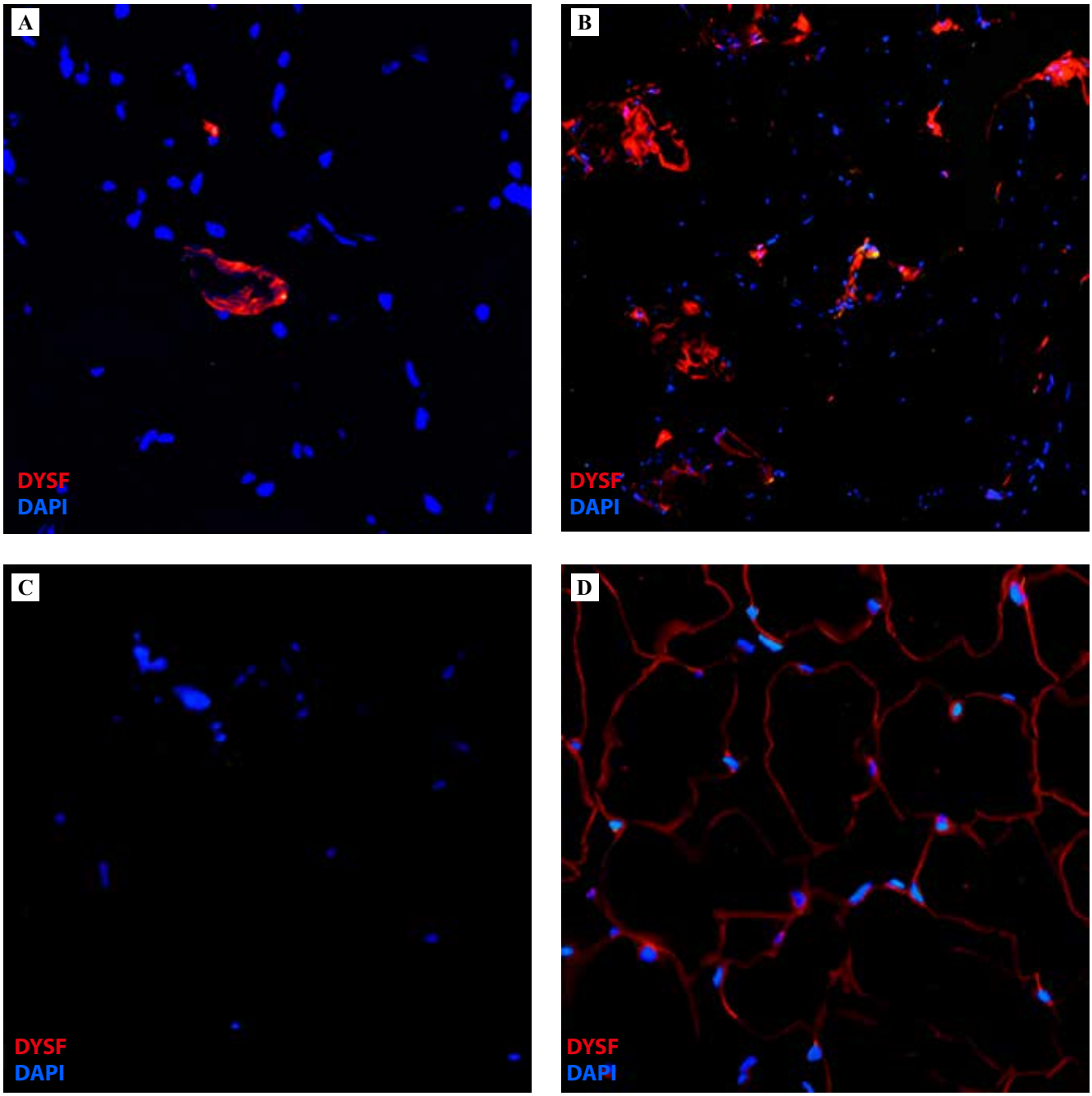


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное исследование поперечных криосрезов икроножных мышц с антителами к дисферлину. Красный сигнал (Alexa Fluor 555) соответствует дисферлину (DYSF), синий сигнал (DAPI) – ядрам клеток. A – единичные трансдуцированные мышечные волокна со смешанным паттерном распределения у мышей Bla/J через 3 месяца после внутривенного введения AAB9.ДИСФ.ДВ. B – группа дисферлин+ волокон со смешанной локализацией у мышей Bla/J через 6 месяцев после системной терапии. C – отсутствие специфического сигнала дисферлина у мышей Bla/J (группа отрицательного контроля). D – сарколеммальная локализация белка у мышей C57Bl/6J (группа положительного контроля). A, C, D – ×400, B – ×200

Fig. 1. Immunofluorescence staining of transverse *m. gastrocnemius* cryosections using anti-dysferlin antibodies. Red signal (Alexa Fluor 555) and blue signal (DAPI) correspond to dysferlin (DYSF and cell nuclei, respectively. A – single transduced muscle fibers with a mixed distribution pattern in Bla/J mice 3 months after IV administration of AAV9.DYSF.DV. B – a cluster of dysferlin-positive fibers with mixed localization in Bla/J mice 6 months after systemic therapy. C – absence of specific dysferlin signal in the negative control (untreated Bla/J mice). D – sarcolemmal protein localization in the positive control (C57Bl/6J mice). A, C, D – ×400, B – ×200

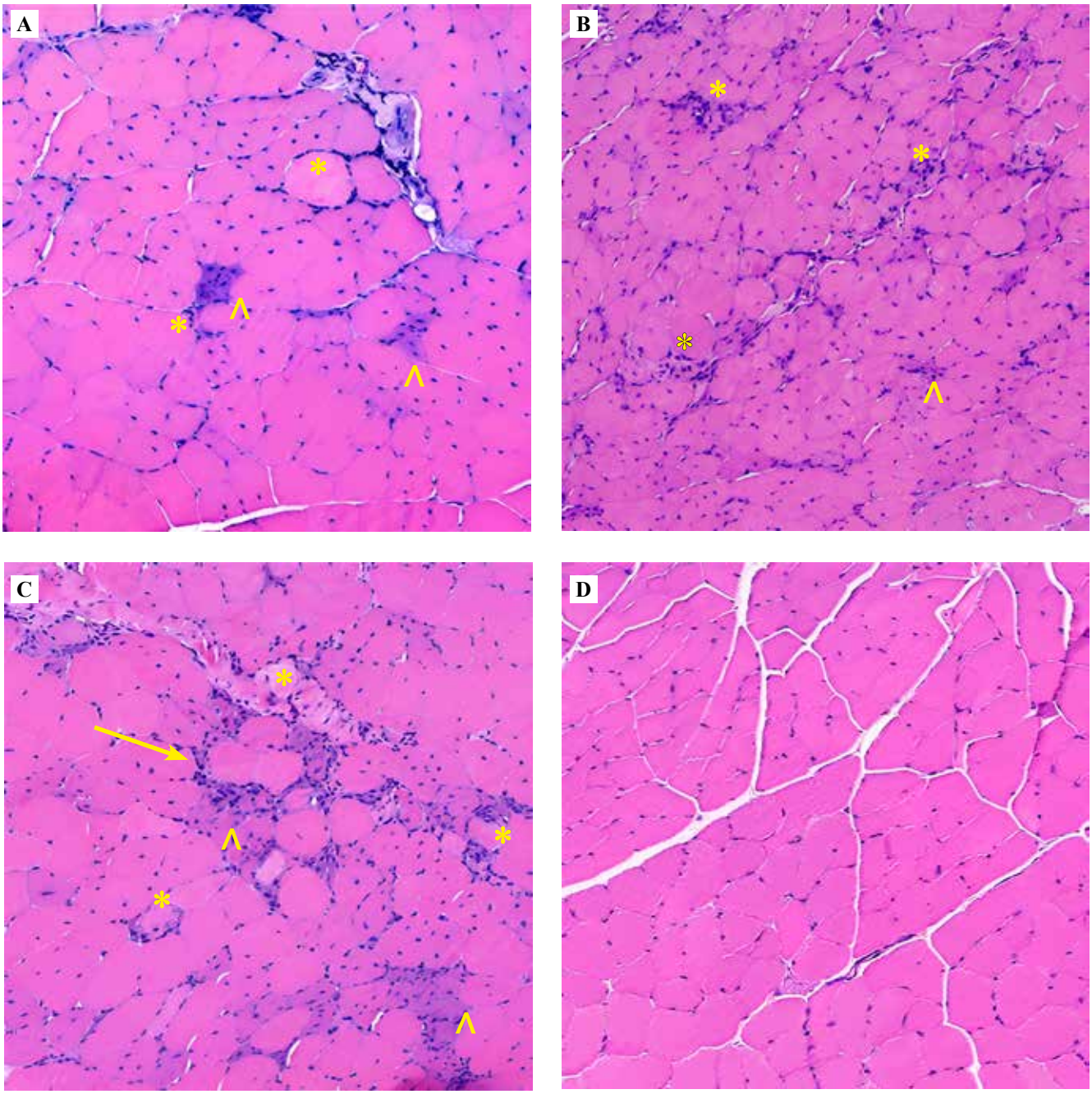


Рис. 2. Патоморфологический анализ поперечных срезов *m. tibialis anterior* мышей экспериментальных групп через 3 месяца и 6 месяцев после начала исследования.
A – мышечная ткань мыши Bla/J через 3 месяца после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ. B – мышечная ткань мыши Bla/J через 6 месяцев после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ. C – скелетная мышечная ткань мыши Bla/J без лечения (группа отрицательного контроля). D – скелетная мышечная ткань мыши C57Bl/6J (группа положительного контроля). *Звездочками* (*) отмечены некротизированные мышечные волокна; символом (∧) указаны группы регенерирующих мышечных волокон с интернализованными ядрами; *стрелкой* (↑) отмечен очаг воспалительной инфильтрации в эндомизии. Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 2. Pathomorphological analysis of transverse *m. tibialis anterior* sections from the experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of the study.
A – muscle tissue of a Bla/J mouse 3 months after systemic administration of AAV9.DYSF.DV. B – muscle tissue of a Bla/J mouse 6 months after systemic administration of AAV9.DYSF.DV. C – skeletal muscle tissue of an untreated Bla/J mouse (negative control). D – skeletal muscle tissue of a C57Bl/6J mouse (positive control). *Asterisks* (*) indicate necrotic muscle fibers; symbols (∧) indicate clusters of regenerating muscle fibers with internalized nuclei; the *arrow* (↑) indicates a focus of inflammatory infiltration in the endomysium. H&E stain, ×200

При сравнении доли некротизированных мышечных волокон внутри группы с терапией AAB была выявлена тенденция к нарастанию деструктивных процессов в *m. tibialis anterior* – среднее значение увеличилось с 1,35% (95% ДИ: 0,44–2,26%) на сроке 3 месяца до 3,92% (95% ДИ: 1,43–6,41%) на сроке 6 месяцев (p=0,094) (рис. 3 B).

Подсчет доли МВ с интернализированными ядрами во всех сроках наблюдения не показал статистически значимых различий между группой с терапией AAB и группой отрицательного контроля(p>0,05) (рис. 3 D–F). Однако при сравнении динамики показателей в двух контрольных точках было обнаружено статистически значимое нарастание показателя в *m. gastrocnemius*

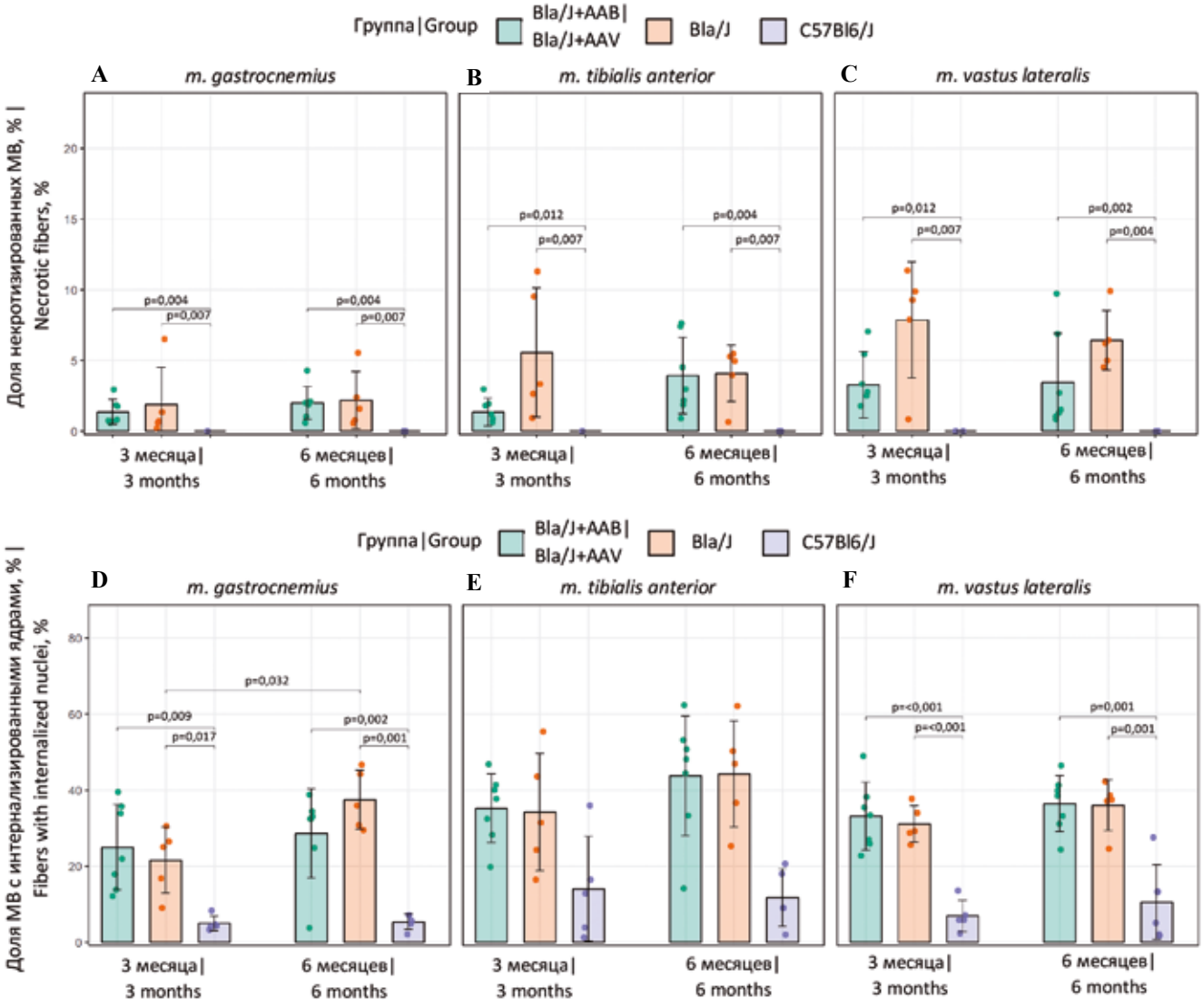


Рис. 3. Доля некротизированных мышечных волокон (%) и МВ с интернализированными ядрами (%) в скелетных мышцах мышей экспериментальных групп на сроках 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Показаны группы: Bla/J (отрицательный контроль), Bla/J+AAB (мыши Bla/J, получившие системную терапию препаратом AAB9.ДИСФ.ДВ) и C57Bl6/J (положительный контроль). Высота столбцов отражает среднее арифметическое значение; вертикальные планки представляют собой 95% доверительный интервал; отдельные точки соответствуют показателям индивидуальных животных (n=5–7 в группе). Статистическая значимость различий рассчитана с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и последующей поправкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

Fig. 3. Percentage of necrotic muscle fibers (%) and muscle fibers with internalized nuclei (%) in skeletal muscles of experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of therapy.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Groups: Bla/J (untreated negative control), Bla/J+AAV (Bla/J mice that received systemic therapy with AAV9.DYSF.DV), and C57Bl6/J (intact positive control). The height of the bars reflects the arithmetic mean; the vertical error bars represent the 95% confidence interval; individual dots correspond to the values of individual animals (5–7 per group). Statistical significance of differences was calculated using the non-parametric Mann–Whitney test with subsequent correction for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg method

в группе отрицательного контроля – среднее значение выросло с 21,58% (95% ДИ: 10,89–32,28%) до 37,46% (95% ДИ: 27,82–47,10%) (p=0,032), тогда как в группе с терапией достоверное нарастание показателя за аналогичный период не зарегистрировано (25,01% на сроке 3 месяца и 28,56% для 6 месяцев, p=0,572), что свидетельствует о стабилизации процесса (рис. 3 D).

В результате количественной оценки через 3 месяца после терапии в экспериментальной группе животных наблюдалось выраженное увеличение площади поперечного сечения МВ по сравнению с аналогичным показателем в группе отрицательного контроля в мышцах голени:

- в *m. gastrocnemius* среднее значение в группе терапии составило 1850,60 мкм² (95% ДИ: 1683,21–2018,00 мкм²) против 1437,69 мкм² (95% ДИ: 1209,17–1666,21 мкм²) в группе отрицательного контроля (p=0,012) (рис. 4 A);
- в *m. tibialis anterior* среднее значение составило 2501,24 мкм² (95% ДИ: 1888,49–3113,98 мкм²) против 1444,17 мкм² (95% ДИ: 1283,08–1605,26 мкм²) в группе животных без лечения (p=0,015) (рис. 4 B).

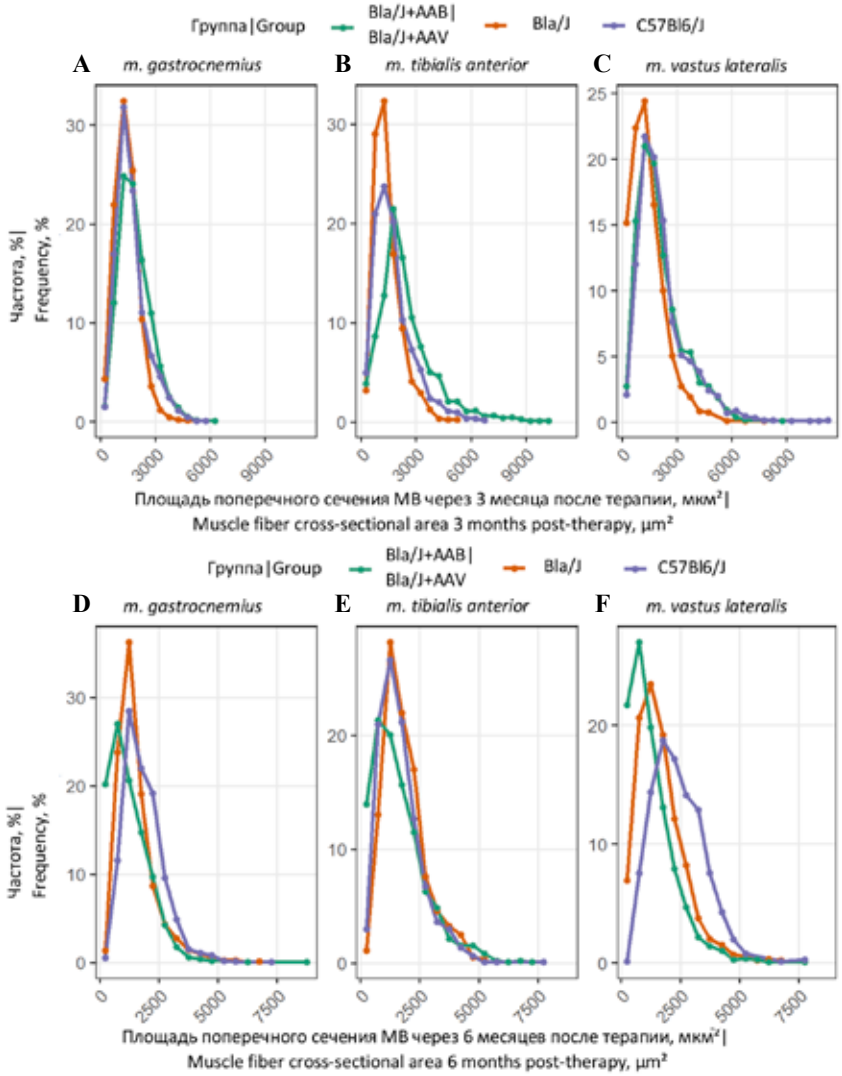


Рис. 4. Частотное распределение площадей поперечного сечения мышечных волокон (%) в скелетных мышцах мышей экспериментальных групп на сроке 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Показаны группы: Bla/J (отрицательный контроль), Bla/J + AAB (мыши Bla/J, получившие системную терапию препаратом AAB9.ДИСФ.ДВ) и C57Bl6/J (положительный контроль). Графики отражают процентное соотношение мышечных волокон различного калибра (размерных классов, мкм²) к общему пулу измеренных профилей в каждой группе (n=5–7 в группе)

Fig. 4. Frequency distribution of muscle fiber cross-sectional areas (%) in skeletal muscles of experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of therapy.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Groups shown: Bla/J (untreated negative control), Bla/J + AAV (Bla/J mice that received systemic therapy with AAV9.DYSF.DV), and C57Bl6/J (intact positive control). The graphs reflect the percentage ratio of muscle fibers of different calibers (size classes, µm²) to the total pool of measured profiles in each group (5–7 per group)

К сроку 6 месяцев показатели площади в группе терапии достоверно не отличались от показателей группы отрицательного контроля во всех трех проанализированных мышцах ($p>0,05$) (рис. 4 D–F).

При исследовании изменения размеров МВ в динамике внутри группы терапии AAB было обнаружено статистически значимое уменьшение площади поперечного сечения волокон на сроке 6 месяцев по сравнению с 3-месячным сроком во всех исследованных мышцах ($p\leq0,05$).

Полные данные описательной статистики по всем трем морфометрическим параметрам во всех группах представлены в таблице.

Таблица | Table

Сводные показатели гистоморфометрического анализа скелетных мышц мышей экспериментальных групп через 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии AAB9.ДИСФ.ДВ | Summary data of histomorphometric analysis of skeletal muscles in experimental groups of mice 3 and 6 months after the initiation of AAV9.DYSF.DV therapy

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
Доля некротизированных мышечных волокон, % | Percentage of necrotic muscle fibers, %						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,35	0,54	2,16
		Bla/J	5	1,88	1,38	5,15
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,35	0,44	2,26
		Bla/J	5	5,56	0,12	11,24
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,28	1,11	5,44
		Bla/J	5	7,86	2,74	12,97
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,99	0,91	3,06
		Bla/J	5	2,17	0,33	4,68
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,92	1,43	6,41
		Bla/J	5	4,07	1,60	6,55
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,43	0,20	6,65
		Bla/J	5	6,42	3,82	9,03
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
Доля волокон с интернализированными ядрами, % | Percentage of fibers with internalized nuclei, %						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	25,01	14,63	35,39
		Bla/J	5	21,58	10,89	32,28
		C57Bl/6J	5	4,98	2,58	7,37

Продолжение таблицы | Table continued

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	35,21	26,82	43,60
		Bla/J	5	34,25	15,07	53,44
		C57Bl/6J	5	14,07	0,00	31,16
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	33,12	24,85	41,38
		Bla/J	5	31,11	25,16	37,05
		C57Bl/6J	5	6,96	1,85	12,07
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	28,56	17,77	39,36
		Bla/J	5	37,46	27,82	47,10
		C57Bl/6J	5	5,36	2,84	7,89
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	43,77	29,21	58,34
		Bla/J	5	44,24	26,91	61,57
		C57Bl/6J	5	11,76	2,42	21,10
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	36,42	29,63	43,21
		Bla/J	5	36,04	27,70	44,38
		C57Bl/6J	5	10,56	0,26	20,86
Площадь поперечного сечения мышечных волокон, мкм^2 | Muscle fiber cross-sectional area, μm^2						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1850,60	1683,21	2018,00
		Bla/J	5	1437,69	1209,17	1666,21
		C57Bl/6J	5	1657,64	1099,66	2215,62
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	2501,24	1888,49	3113,98
		Bla/J	5	1444,17	1283,08	1605,26
		C57Bl/6J	5	1739,47	701,92	2777,03
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	2157,22	1473,21	2841,23
		Bla/J	5	1484,17	883,53	2084,80
		C57Bl/6J	5	2052,23	1106,56	2997,90
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1258,00	866,31	1649,70
		Bla/J	5	1561,45	1161,83	1961,08
		C57Bl/6J	5	1939,83	1514,78	2364,87

Окончание таблицы | End of table

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1600,28	1192,61	2007,96
		Bla/J	5	1889,67	1563,71	2215,62
		C57Bl/6J	5	1829,36	1028,80	2629,91
	m. vastus lateralis	Bla/J +AAB | Bla/J + AAV	7	1231,64	996,00	1467,28
		Bla/J	5	1652,49	1094,02	2210,96
		C57Bl/6J	5	2448,90	1653,71	3244,08

Обсуждение

Паттерн распределения трансгенного белка

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил сборку полноразмерного белка дисферлина *in vivo*, что согласуется с механизмом объединения перекрывающихся векторов [13]. Тем не менее его локализация имела смешанный паттерн распределения: в волокнах регистрировались выраженные цитоплазматические агрегаты и субсарколеммальные депо белка. Такое распределение отличается от равномерного сарколеммального в норме и определяет необходимость анализа его причин.

Накопление усеченных продуктов трансляции как фактор образования агрегатов маловероятно из-за строгой топологии перекрывающейся системы. Наличие промотора только в 5′-векторе и сигнала полиаденилирования только в 3′-векторе ограничивает независимую транскрипцию несобранных половин. Это подтверждается данными литературы, где при аналогичной векторной архитектуре укороченные формы белка *in vivo* не выявлялись [14]. Следовательно, наблюдаемые цитоплазматические скопления с наибольшей вероятностью представляют собой полноразмерный дисферлин на этапе посттрансляционного процессинга, а не его N- или C-концевые фрагменты. Более того, функциональная состоятельность *de novo* синтезированного дисферлина на данной когорте животных подтверждена в смежной работе, где было зафиксировано статистически значимое улучшение мышечной силы и локомоторных показателей у мышей после терапии по сравнению с показателями в отрицательной контрольной группе [15]. Таким образом, несмотря на нетипичное внутриклеточное распределение, собранный белок сохраняет свою функциональность.

Природа смешанного паттерна локализации дисферлина допускает несколько объяснений. Основной гипотезой является локальная сверхэкспрессия белка в волокнах с высокой копийностью вектора. При интенсивном синтезе крупного трансмембранного белка скорость его наработки может превышать пропускную способность аппарата фолдинга и везикулярного транспорта, приводя к депонированию незрелых форм. Принципиальная возможность такого стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) показана на трансгенной модели с экстремальной конститутивной сверхэкспрессией дисферлина, приводившей к дозозависимой миопатии [16]. Однако наличие безопасного терапевтического окна подтверждается данными D.P. Millay et al., где умеренная (3–3,5-кратная) сверхэкспрессия дисферлина у трансгенных мышей не вызывала патологии, обеспечивала правильное сарколеммальное встраивание и полностью устраняла дистрофический фенотип [17]. Это свидетельствует о том, что стресс ЭПР возникает лишь при значительном избытке белка, тогда как в исследовании доля трансдуцированных мышечных волокон не превышала 4%.

Альтернативной причиной скоплений может являться дисбаланс белков-партнеров (аннексины, AHNAK, кавеолин-3), необходимых для правильного встраивания дисферлина в волокнах, длительно находившихся в условиях его дефицита [18]. Окончательное разграничение этих механизмов требует будущей экспериментальной проверки, включающей вестерн-блот анализ на полноразмерность белка и оценку его колокализации с маркерами ЭПР и аппарата Гольджи.

Динамика изменений доли некротизированных волокон

Эксперимент выявил выраженную гетерогенность терапевтического ответа по уровню некроза в зависимости от мышечной группы. На сроке 3 месяца в *m. vastus lateralis* (3,28% против 7,86%, p=0,067) и *m. tibialis anterior* (1,35% против 5,56% в группе Bla/J, p=0,163) доля некротизированных МВ снизи-

лась в 2 раза и более. Однако к 6 месяцам в *m. tibialis anterior* доля некрозов выросла до 3,92% (p=0,094), тогда как в *m. vastus lateralis* терапевтический эффект оставался стабильным (3,28% некрозов на сроке 3 месяца против 3,43% на сроке 6 месяцев, p=0,926).

Постепенное снижение гистопротекторного действия конструкции к 6-му месяцу может носить комплексный характер. С одной стороны, оно связано с фундаментальным свойством векторов AAB персистировать в ядрах в виде неделящихся кольцевых эписом [19]. Хотя инъекция проводилась взрослым животным (7 месяцев), в их мышцах протекает хронический дегенеративно-регенеративный процесс, требующий постоянного восстановления ткани. При неизменном количестве вирусных эписом объем саркоплазмы и количество ядер увеличиваются, вызывая эписомальную дилюцию (episomal dilution – постепенное снижение копийности генома вектора в расчете на мышечное ядро и элиминацию эписом в ходе дегенеративно-регенераторного цикла), на фоне чего снижается концентрация терапевтического белка [20]. С другой стороны, к постепенному снижению наработки терапевтического белка со временем может приводить его эпигенетический сайленсинг (например, метилирование промотора гена) [21]. Кроме того, поскольку мыши Bla/J характеризуются полным блоком синтеза собственного дисферлина, *de novo* синтезируемый человеческий белок (несмотря на высокую степень эволюционной консервативности) может распознаваться иммунной системой нокаутных животных как чужеродный антиген, постепенно запуская Т-клеточный ответ и элиминацию трансдуцированных мышечных волокон.

Скорость этого процесса определяется особенностями состава мышечных волокон и различиями в интенсивности клеточного обновления (дегенерации и регенерации) в различных мышечных группах. Хотя в условиях поддержания веса тела и локомоции обе мышцы (*m. tibialis anterior* и *m. vastus lateralis*) испытывают значительную эксцентрическую нагрузку, *m. tibialis anterior* в моделях мышечных дистрофий характеризуется более высокой частотой повреждения [22]. Это может быть обусловлено преобладанием в *m. tibialis anterior* быстрых гликолитических мышечных волокон IIb типа, которые наиболее чувствительны к разрывам сарколеммы при напряжении в условиях дефицита дисферлина. В то время как *m. vastus lateralis* обладает более гетерогенным профилем (включая окислительно-гликолитические волокна глубоких слоев) [23], *m. tibialis anterior* подвергается более регулярной и выраженной деструкции, что ускоряет элиминацию эписом вектора в ходе интенсивного клеточного обновления. Напротив, более медленная динамика регенераторных процессов в *m. vastus lateralis* позволяет дольше сохранять стабильную копийность эписом в ядрах вплоть до 6 месяцев наблюдения, несмотря на испытываемую мышцей нагрузку.

Стабилизация доли волокон с интернализированными ядрами

Отсутствие абсолютного снижения доли волокон с интернализированными ядрами у мышей после терапии по сравнению с параметрами отрицательной контрольной группы (p>0,05) биологически закономерно для грызунов. В отличие от человека у мышей интернализированные ядра являются пожизненными «гистологическими рубцами» регенерации и практически не мигрируют на периферию, свидетельствуя о пройденных в прошлом циклах некроза [24]. Поскольку конструкция вводилась взрослым животным в возрасте 7 месяцев, значительный стартовый пул МВ с интернализацией в мышцах уже успел сформироваться и был биологически необратим.

Гистопротекторная активность препарата подтверждается динамикой показателя во времени. В *m. gastrocnemius* у особей группы отрицательного контроля зафиксировано нарастание доли МВ с интернализированными ядрами с 21,58 до 37,46% (p=0,032), отражающее непрерывный дегенеративно-регенеративный цикл патологии. В то же время в группе терапии показатель был полностью стабилизирован (рост с 25,01 до 28,56% статистически недостоверен, p=0,572). Это доказывает, что экспрессия дисферлина защитила мембраны от разрывов и предотвратила запуск новых циклов некроза–регенерации.

Двухфазная динамика площади поперечного сечения мышечных волокон

Подсчет средней площади поперечного сечения мышечных волокон выявил разнонаправленные изменения. На сроке 3 месяца зафиксирована реверсия атрофии: площадь волокон значимо увеличилась в *m. gastrocnemius* (p=0,012) и *m. tibialis anterior* (p=0,015) по сравнению с показателем площади в группе отрицательного контроля. Однако к 6 месяцам этот эффект угас и произошло достоверное уменьшение площади во всех исследованных группах мышц по сравнению с 3-месячной точкой: в *m. gastrocnemius* (p=0,018), *m. tibialis anterior* (p=0,015) и *m. vastus lateralis* (p=0,031).

Это уменьшение размеров мышечных волокон является также следствием описанных выше процессов снижения гистопротективного действия. К 6-му месяцу наблюдения в условиях хронического дегенеративно-регенеративного процесса в развернутой стадии заболевания концентрация терапевтического белка на сарколемме снизилась ниже терапевтического порога, что привело к постепенному возобновлению дистрофических изменений. Использованная умеренная доза 5×10^{12} вг/кг оказалась недостаточной для поддержания терапевтического порога дисферлина к 6-му месяцу. Схожие изменения описаны в клинических исследованиях препаратов для лечения миодистрофии Дюшенна (Elevidys) и саркогликанопатий (SRP-9003), где для создания «ядерного резерва» вектора применяются более высокие дозировки (до $1,33\times10^{14}$ вг/кг) [25, 26].

Ограничения исследования

При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать ряд ограничений настоящего исследования. Во-первых, в рамках данной работы не проводилась прямая верификация молекулярной массы собранного белка методом вестерн-блоттинга. Хотя молекулярный дизайн используемой двухвекторной системы исключает экспрессию изолированных усеченных фрагментов, прямая оценка полноразмерности *de novo* синтезированного белка повысит точность выводов в будущих исследованиях. Во-вторых, потенциальный гуморальный и клеточный иммунный ответ на системное введение вектора AAB9 (включая антикапсидные нейтрализующие антитела) или на длительную экспрессию человеческого трансгена у дисферлин-дефицитных животных также остался за рамками настоящей статьи и требует детальной экспериментальной оценки в последующих работах. Наконец, к ограничениям исследования следует отнести относительно небольшой объем выборок животных в группах и умеренный период наблюдения (6 месяцев), что не позволяет в полной мере оценить долгосрочную стабильность действия разработанной конструкции.

Заключение

В настоящем исследовании *in vivo* получены морфологические свидетельства гистопротекторного действия системного введения оригинальной двухвекторной конструкции AAB9.ДИСФ.ДВ на модели дисферлинопатии на раннем и среднем сроках наблюдения. Однократная внутривенная инъекция обеспечила восстановление синтеза дисферлина во всех исследованных скелетных мышцах, причем доля трансдуцированных волокон сохранялась стабильной между 3-м и 6-м месяцами ($p=0,749$), оставаясь при этом невысокой. На сроке 3 месяца зарегистрирован морфологический эффект: значимое увеличение площади поперечного сечения волокон в *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* и тенденция к снижению доли некротизированных волокон в мышцах голени. К 6 месяцам этот эффект ослабевал – площадь волокон значимо уменьшалась во всех исследованных мышцах относительно 3-месячного срока, что отражает возврат показателей к дистрофическому уровню в группе отрицательного контроля и может быть связано с постепенным снижением концентрации белка в хронически регенерирующей ткани. Признаком сохраняющегося защитного действия осталась динамика доли волокон с интернализированными ядрами в *m. gastrocnemius*, где в группе терапии в отличие от животных отрицательного контроля значимое нарастание показателя не отмечено. Полученные данные свидетельствуют о работоспособности платформы при системной доставке и указывают на необходимость ее дальнейшей оптимизации (в частности, для минимизации рисков формирования внутриклеточных агрегатов и преодоления снижения концентрации терапевтического белка) с целью удержания достигнутого эффекта.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – И.А. Яковлев, А.А. Исаев, Р.В. Деев.
Сбор и обработка материала – И.А. Яковлев, И. Сорочану, А.М. Емелин, И.С. Лимаев, Д.В. Вдовина, Ю.А. Ветрова.
Подготовка иллюстративного материала – И.С. Лимаев, Д.В. Вдовина, Ю.А. Ветрова.
Статистическая обработка данных и графический материал – И.А. Яковлев, Н.С. Гладышев.
Написание текста – И.А. Яковлев, И. Сорочану.
Редактирование – Р.В. Деев.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, R.V. Deev.
Collected the data and performed the analysis – I.A. Yakovlev, I. Sorochanu, A.M. Emelin, I.S. Limaev, D.V. Vdovina, Iu.A. Vetrova.
Preparation of illustrative material – I.S. Limaev, D.V. Vdovina, Iu.A. Vetrova.
Statistical data processing and graphic material – I.A. Yakovlev, N.S. Gladyshev.
Wrote the paper – I.A. Yakovlev, I. Sorochanu.
Edited the manuscript – R.V. Deev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют о наличии потенциального конфликта интересов: ООО «Генотаргет» – разработчик исследуемого генно-терапевтического препарата для лечения дисферлинопатии. И.А. Яковлев является генеральным директором и соучредителем ООО «Генотаргет», И. Сорочану – научным сотрудником, А.А. Исаев и Р.В. Деев – соучредителями ООО «Генотаргет». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare the following potential conflict of interest: LLC Genotarget is the developer of the investigated gene therapy drug for dysferlinopathy treatment. I.A. Yakovlev is the CEO; I. Sorochanu is an employee; and I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, and R.V. Deev are co-founders of LLC Genotarget. The other authors declare no conflict of interest.

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам Белгородского государственного национального исследовательского университета за проведение всех экспериментальных манипуляций на животных *in vivo*, включая их содержание, уход, введение препарата и последующее выведение из эксперимента.

Acknowledgments. The authors would like to acknowledge Belgorod State National Research University for performing all *in vivo* animal procedures and manipulations, including animal housing, husbandry, vector administration, and euthanasia.

Литература/References

1. Orphanet. Dysferlin-related limb-girdle muscular dystrophy R2 [Internet]. Paris: INSERM; 2026. Available from: https://www.orpha.net/en/disease/detail/268 (accessed 11.06.2026).
2. *Anwar S, Yokota T.* The dysferlinopathies conundrum: clinical spectra, disease mechanism and genetic approaches for treatments. Biomolecules. 2024;14(3):256. DOI: 10.3390/biom14030256.
3. *Aoki M, Takahashi T.* Dysferlinopathy. 2004 Feb 5 [Updated 2025 Dec 4]. In: MP Adam, S Bick, GM Mirzaa (eds.). GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1303/ (accessed 11.06.2026).
4. *Umakhanova ZR, Bardakov SN, Mavlikeev MO, Chernova ON, Magomedova RM, Akhmedova PG et al.* Twenty-year clinical

progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. Front Neurol. 2017;8:77. DOI: 10.3389/fneur.2017.00077.
5. *Bardakov SN, Deev RV, Tsargush VA, Kaimonov VS, Musatova EV, Blagodatskikh KA et al.* Asymptomatic and oligosymptomatic states of dysferlinopathy. J Neuromuscul Dis. 2024;11(6):1283–94. DOI: 10.1177/22143602241289227.
6. *Au HKE, Isalan M, Mielcarek M.* Gene therapy advances: a meta-analysis of AAV usage in clinical settings. Front Med (Lausanne). 2022;8:809118. DOI: 10.3389/fmed.2021.809118.
7. *Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN et al.* AAV.Dysferlin overlap vectors restore function in dysferlinopathy animal models. Ann Clin Transl Neurol. 2015;2(3):256–70. DOI: 10.1002/acn3.172.
8. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. DYSF dysferlin [Homo sapiens (human)]. Gene ID: 8291. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2026. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8291 (accessed 27.05.2026).
9. *Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR.* Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther. 1999;10(6):1031–9. DOI: 10.1089/104303499500 18427.
10. *Yakovlev IA, Emelin AM, Slesarenko YS, Limaev IS, Vetrova IA, Belikova LD et al.* Dual adeno-associated virus 9 with codon-optimized DYSF gene promotes *in vivo* muscle regeneration and may decrease inflammatory response in limb girdle muscular dystrophy type R2. Int J Mol Sci. 2023;24(17):13551. DOI: 10.3390/ijms241713551.
11. *Potter RA, Griffin DA, Sondergaard PC, Johnson RW, Pozsgai ER, Heller KN et al.* Systemic delivery of dysferlin overlap vectors provides long-term gene expression and functional improvement for dysferlinopathy. Hum Gene Ther. 2018;29(7):749–62. DOI: 10.1089/hum.2017.062.
12. *Корокин М.В., Кузубова Е.В., Радченко А.И., Деев Р.В., Яковлев И.А., Дейкин А.В. и др.* Мыши B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. Фармация и фармакология. 2022;10(5):483–496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496.
Korokin MV, Kuzubova EV, Radchenko AI, Deev RV, Yakovlev IA, Deikin AV et al. B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ mice as a genetic model of dysferlinopathy. Pharmacy & Pharmacology. 2022;10(5):483–496 (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496.
13. *Pryadkina M, Lostal W, Bourg N, Charton K, Roudaut C, Hirsch ML et al.* A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. Mol Ther Methods Clin Dev. 2015;2:15009. DOI: 10.1038/mtm.2015.9.
14. *Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S et al.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. EMBO Mol Med. 2014;6(2):194–211. DOI: 10.1002/emmm.201302948.
15. *Kuzubova EV, Radchenko AI, Manuylov AA, Korokina AM, Koroleva NV, Yakovlev IA et al.* Assessment of physiological parameters in the application of a double adeno-associated virus 9 with a codon-optimized DYSF gene for limb girdle muscular dystrophy type R2. Research Results in Pharmacology. 2025;11(2):36-47. DOI: 10.18413/rrpharmacology.11.642.
16. *Glover LE, Newton K, Krishnan G, Bronson R, Boyle A, Krivickas LS et al.* Dysferlin overexpression in skeletal muscle produces a progressive myopathy. Ann Neurol. 2010;67(3):384–93. DOI: 10.1002/ana.21926.
17. *Millay DP, Maillet M, Roche JA, Sargent MA, McNally EM, Bloch RJ et al.* Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. Am J Pathol. 2009;175(5):1817–23. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090107.
18. *Cárdenas AM, González-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P.* Dysferlin function in skeletal muscle: possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. Exp Neurol. 2016;283(Pt A):246–54. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.06.026.
19. *Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, Chenuaud P et al.* Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. J Virol. 2008;82(16):7875–85. DOI: 10.1128/JVI.00649-08.
20. *Morgan J, Muntoni F.* Changes in myonuclear number during postnatal growth – implications for AAV gene therapy for muscular dystrophy. J Neuromuscul Dis. 2021;8(s2):S317–24. DOI: 10.3233/JND-210683.
21. *Chanda D, Hensel JA, Higgs JT, Grover R, Kaza N, Ponnazhagan S.* Effects of cellular methylation on transgene expression and site-specific integration of adeno-associated virus. Genes (Basel). 2017;8(9):232. DOI: 10.3390/genes8090232.
22. *Dellorusso C, Crawford RW, Chamberlain JS, Brooks SV.* Tibialis anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. J Muscle Res Cell Motil. 2001;22(5):467–75. DOI: 10.1023/a:1014587918367.
23. *Bloemberg D, Quadrilatero J.* Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. PLoS One. 2012;7(4):e35273. DOI: 10.1371/journal.pone.0035273.
24. *Meyer GA.* Evidence of induced muscle regeneration persists for years in the mouse. Muscle Nerve. 2018;58(6):858–62. DOI: 10.1002/mus.26329.
25. *Mendell JR, Muntoni F, McDonald CM, Mercuri EM, Ciafaloni E, Komaki H et al.* AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the EMBARK phase 3 randomized trial. Nat Med. 2025;31(1):332–41. DOI: 10.1038/s41591-024-03304-z.
26. *Mendell JR, Pozsgai ER, Lewis S, Griffin DA, Lowes LP, Alfano LN et al.* Gene therapy with bidridistrogene xeboparvovec for limb-girdle muscular dystrophy type 2E/R4: phase 1/2 trial results. Nat Med. 2024;30(1):199–206. DOI: 10.1038/s41591-023-02730-9.

Информация об авторах

Иван Антонович Яковлев – генеральный директор ООО «Генотаргет».

Ирина Сорочану – научный сотрудник ООО «Генотаргет», младший научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Алексей Михайлович Емелин – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Никита Сергеевич Гладышев – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Игорь Сергеевич Лимаев – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Дарья Владимировна Вдовина – ординатор первого года обучения по патологической анатомии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Юлия Андреевна Ветрова – врач-патологоанатом ООО «Медицинский институт имени Березина Сергея».

Артур Александрович Исаев – председатель совета директоров ПАО «Артген биотех».

Роман Вадимович Деев – кандидат медицинских наук, доцент, исполняющий обязанности директора НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, член совета директоров ПАО «Артген биотех».

Author information

Ivan A. Yakovlev – CEO, LLC Genotarget.
https://orcid.org/0000-0001-8127-4078

Irina Sorochanu – Researcher, LLC Genotarget; Junior Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0002-6909-8937

Alexei M. Emelin – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0003-4109-0105

Nikita S. Gladyshev – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Igor S. Limaev – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0002-0994-9787

Daria V. Vdovina – 1st-year Pathology Resident, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0009-0005-0993-9430

Iuliia A. Vetrova – Pathologist, LLC Oncologic Clinic MIBS.
https://orcid.org/0000-0003-3627-4962

Artur A. Isaev – Chairman of the Board of Directors, PJSC Artgen Biotech.
https://orcid.org/0000-0001-5848-5117

Roman V. Deev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Acting Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI Petrovsky National Research Centre of Surgery; Member of the Board of Directors, PJSC Artgen Biotech.
https://orcid.org/0000-0001-8389-3841

© Sagdullaeva S.A., Koniaeva A.D., Varakuta E.Yu, Bolbasov E.N., Chernova U.V., Kukartseva O.V., 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.45-55

Morphological characteristics of the microcirculatory network in regenerating purulent wounds with piezoelectric polymer smart membranes

S.A. Sagdullaeva[1], A.D. Koniaeva[1], E.Yu. Varakuta[1], E.N. Bolbasov[2], U.V. Chernova[2], O.V. Kukartseva[2]

[1] Siberian State Medical University, Tomsk, Russia
[2] National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Abstract. *Introduction.* Purulent oral wounds are associated with marked microcirculatory disturbances that impair tissue regeneration. Therefore, wound coverings that restore the vascular component are of particular interest. This study evaluated morphological changes in the microcirculatory network during regeneration of purulent oral wounds treated with antibacterial piezoelectric polymer smart membranes.
Materials and methods. Sixty Wistar rats were divided into four groups (n=15 each): untreated purulent wounds, smart membranes without an antibacterial layer, smart membranes with an antibacterial layer, and intact controls. On days 3, 7, and 14, we assessed the Kernohan index, pericapillary diffusion index, arteriolar-venular ratio, numerical density of altered arterioles and venules, VEGF expression, and endothelial ultrastructure.
Results. Early inflammation-associated microcirculatory disturbances occurred in all wound groups. Membrane-treated groups showed partial microcirculatory recovery by day 7. On day 14, VEGF expression in groups 2 and 3 was 2.8- and 5.8-fold higher, respectively than in the untreated group (p=0.0287 and p=0.0001). In group 3, most parameters approached intact-control values. In the untreated group, however, the Kernohan index remained 1.5-fold higher (p=0.0027) and the arteriolar-venular ratio 1.3-fold lower (p=0.0035) than in intact controls, with numerous altered arterioles and venules.
Conclusion. Antibacterial piezoelectric polymer smart membranes promoted angiogenic activity and accelerated restoration of the microcirculatory network in purulent oral wounds, with near-normalization of most parameters by day 14.

Keywords: purulent wound, smart materials, regeneration, piezoelectrics, microcirculation

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

For citation: Sagdullaeva S.A., Koniaeva A.D., Varakuta E.Yu, Bolbasov E.N., Chernova U.V., Kukartseva O.V. Morphological characteristics of the microcirculatory network in regenerating purulent wounds with piezoelectric polymer smart membranes. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):45–55. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.45-55.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The comprehensive morphological study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation within the framework of scientific project No. 23-25-00346. The production of antibacterial smart coatings was completed at Tomsk Polytechnic University with the support of Priority-2030-IZ-025-202-2024 project.

Received 19.03.2026. **Received in revised form** 13.04.2026. **Accepted** 14.05.2026.

УДК: 616-018

Морфологическая характеристика микроциркуляторного русла при регенерации гнойной раны с использованием антибактериальных пьезоэлектрических полимерных смарт-мембран

С.А. Сагдуллаева[1], А.Д. Коняева[1], Е.Ю. Варакута[1], Е.Н. Больбасов[2], У.В. Чернова[2], О.В. Кукарцева[2]

[1] ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия
[2] ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

Резюме. *Введение.* Гнойные раны ротовой полости характеризуются выраженным нарушением микроциркуляции, являющимся ключевым звеном патогенеза в ходе регенерации. Актуальность приобретает разработка покрытий, благоприятно влияющих на восстановление сосудистого компонента. Целью исследования явилось проведение морфологической оценки состояния микроциркуляции в зоне

регенерации гнойной раны слизистой оболочки полости рта при использовании антибактериальных пьезоэлектрических полимерных смарт-мембран.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 60 крысах линии Вистар, разделенных на группы: 1-я (n=15) – регенерация гнойной раны без покрытия, 2-я (n=15) – применение смарт-мембраны без антибактериального напыления, 3-я (n=15) – применение смарт-мембраны с антибактериальным напылением, 4-я (n=15) – интактные животные. Индексы Керногана и перикапиллярной диффузии, артериоло-венулярное взаимоотношение, численная плотность измененных артериол и венул, ультраструктурные изменения эндотелиоцитов, экспрессия VEGF исследовались на 3-и, 7-е и 14-е сутки эксперимента.

Результаты. В ранние сроки в экспериментальных группах выявлялись выраженные воспалительно ассоциированные нарушения микроциркуляции. В группах с раневым покрытием частичное восстановление микроциркуляции отмечалось уже на 7-е сутки исследования. Значимое повышение экспрессии VEGF, отражающее ангиогенез, отмечалось на 14-е сутки во 2-й и 3-й группах и было в 2,8 и 5,8 раза достоверно выше, чем в 1-й группе (p=0,0287; p=0,0001). Остальные показатели в 3-й группе на 14-е сутки восстанавливались до значений у интактных особей. В 1-й группе индекс Керногана был в 1,5 раза достоверно больше (p=0,0027), а артериоло-венулярное взаимоотношение в 1,3 раза значимо ниже (p=0,0035), чем в группе контроля, в большом количестве визуализировались измененные артериолы и венулы.

Заключение. Применение антибактериальных пьезоэлектрических полимерных смарт-мембран обеспечивало восстановление микроциркуляторного русла за счет нормализации эндотелиальной функции, гемодинамики и процессов ангиогенеза. Выявленные изменения свидетельствовали о формировании функционально зрелой сосудистой сети в более короткие сроки по сравнению с другими экспериментальными группами.

Ключевые слова: гнойная рана, смарт-материалы, регенерация, пьезоэлектрики, микроциркуляция

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

Для цитирования: Сагдуллаева С.А., Коняева А.Д., Варакута Е.Ю., Больбасов Е.Н., Чернова У.В., Кукарцева О.В. Морфологическая характеристика микроциркуляторного русла при регенерации гнойной раны с использованием антибактериальных пьезоэлектрических полимерных смарт-мембран. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):45–55. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.45-55.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Комплексное морфологическое исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-25-00346. Изготовление антибактериальных смарт-покрытий выполнено в Томском политехническом университете при поддержке проекта «Приоритет-2030-ИЗ-025-202-2024».

Статья поступила 19.03.2026. **Получена после рецензирования** 13.04.2026. **Принята в печать** 14.05.2026.

Introduction

Treating purulent wounds remains a significant challenge in surgical dentistry due to their high incidence, tendency for chronic inflammation, and the development of severe infectious and deformational complications [1].

Modern approaches to managing purulent wounds are increasingly focused not only on suppressing microbial contamination but also on creating favorable local environment for tissue regeneration. In this context, the development of wound dressings that combine antibacterial properties and modulate local tissue responses is of particular interest [2].

Polymers with piezoelectric properties belong to smart materials capable of interacting with the biological environment when biointegrating [3]. Available data suggest that their use is associated with diminished postoperative scarring and may promote more effective repair of purulent wounds that usually heal by secondary intention, where coarse fibrous connective tissue is typically formed [4]. In addition, several studies have investigated the influence of piezoelectric membranes on the healing of aseptic skin wounds and full 3D skin reconstruction [5].

At the same time, antibacterial coatings that provide prolonged release of antimicrobial agents directly at the wound site allow to reduce the bacterial load and minimize the systemic effects of antibiotic therapy, which may contribute to a more favorable course of wound healing [6].

A polymer-based piezoelectric membrane was created at the Shared Access Additive Technology Center of the National Research Tomsk Polytechnic University and proved to be effective in the treatment of non-purulent wounds of the oral mucosa [7]. A distinctive feature of the membrane is that it is able to modify its surface with various pharmaceutical agents, including antibacterial compounds. Therefore, the present study examines the local effects of piezoelectric polymer smart membranes modified with an antibacterial agent [8] in purulent wound regeneration.

This paper focuses on the results related to the restoration of the microcirculatory bed, since microcirculato-

ry disturbances in the area of injury are considered a key pathogenic factor that impedes adequate tissue regeneration and contributes to persistent inflammation. In purulent inflammation, the structural organization of the microvascular network undergoes pronounced alterations, including endothelial dysfunction, vascular stasis, increased vascular permeability, and impaired angiogenesis. These changes lead to tissue hypoxia, delayed reparative processes, and the formation of morphologically and functionally inferior connective tissue.

Most studies on wound dressings concentrate primarily on clinical outcomes and the dynamics of wound healing, whereas the morphological changes occurring in the microcirculatory bed within the regeneration zone remain insufficiently investigated. However, the structural organization of the vascular network largely determines the quality of the newly formed tissue and the functional outcome of wound healing. The study of microvascular network, pathological alterations, density, and the degree of maturity of microvessels makes it possible to gain deeper insight into the mechanisms underlying the influence of local antibacterial therapy on reparative processes and to substantiate the prospects for the use of modern wound dressings as part of a pathogenetically oriented treatment of purulent wounds [9].

Thus, the aim of this research was to perform a morphological assessment of microcirculatory vessel changes in healing purulent oral mucosa wounds following the application of antibacterial piezoelectric polymer smart membranes.

Materials and methods

We designed the experiment as a comparative exploratory study in order to investigate the morphological aspects of purulent wound regeneration of the oral mucosa following the application of piezoelectric polymer smart membranes with and without antibacterial properties.

Experimental wound dressing samples were designed and fabricated at the Shared Access Additive Technology Center of National Research Tomsk Polytechnic University from powder of vinylidene fluoride-tetrafluoroethylene copolymer (VDF-TeFE, Galopolymer, Russia) using electrospinning technique. Two types of polymer piezoelectric smart membranes were developed: piezoelectric polymer membranes and piezoelectric polymer membranes containing an antibacterial agent.

We developed the smart covering membrane modified with an antibiotic agent in order to evaluate the ability of the piezoelectric wound dressing to provide a prolonged local antibacterial effect. Vancomycin served as the model antibacterial agent because of its pronounced activity against Gram-positive microorganisms, particularly *Staphylococcus aureus*, a strain of which was used to establish a model of a purulent wound. Moreover, vancomycin possesses a well-characterized mechanism of action, predictable antibacterial efficacy, and high chemical stability [10].

The study was conducted at the Siberian State Medical University, and the experimental protocol was approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, protocol No. 1 dated December 16, 2022). All animal procedures were performed in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

The experiment included 60 three-month-old male Wistar rats weighing 250–300 g, provided by Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk, Russia). The animals were housed under standard vivarium conditions in accordance with the sanitary and epidemiological requirements for experimental biological facilities established by 2.2.1.3218-14 "On Sanitary and Epidemiological Requirements for the Design, Equipment, and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivariums)," approved by the Russian Federation Chief State Sanitary Doctor Resolution No. 51 of August 29, 2014. Prior to the experiment, all animals underwent a two-week acclimatization period.

We randomly assigned the animals to four equal groups using block randomization. Groups 1–3 were experimental: group 1 included animals in which the wound defect was not covered with a piezoelectric polymer smart membrane; group 2, those in which it was covered with a non-modified piezoelectric polymer smart membrane; and group 3, those in which the defect was covered with antibacterial piezoelectric polymer smart membrane. Group 4 served as the control group and comprised animals with intact oral mucosa.

All surgical procedures were performed in accordance with the Refinement principle of the 3Rs. Premedication was administered using atropine sulfate (Dalchimpharm, Russia) at a dose of 0.04 mg/kg subcutaneously 30 minutes prior to induction of anesthesia with Zoletil-100 (Virbac, France) at a dose of 10 mg/kg. Criteria for animal removal, followed by euthanasia, included deterioration of general condition manifested by lethargy, apathy, refusal to eat, sleep disturbances, fever, or premature death. No animals were excluded from the study.

The experimental model of a purulent wound was created using the following procedure. In groups 1–3, a mucosal flap measuring 5 × 2 mm was excised from the buccal region using a standardized template. Subsequently, the wound margins and bottom were mechanically crushed with a Kocher clamp for 4 minutes and infected by applying a suspension of a 24-hour culture of *Staphylococcus aureus* at a concentration of 1×10^9 microbial bodies per 1 mL of physiological saline to a foam pellet (Pele Tim No. 1, d=4 mm); the total volume of the microbial suspension applied was 0.4 mL. After inoculation, we tightly sutured the wound edges with the foam pellet using PGA 4/0 suture material.

On day 3, we removed the sutures, extracted the foam pellet, and irrigated the wound with 1 mL of physiological saline. Following this, in groups 2 and 3, a smart membrane

was fixed along the wound margins using simple interrupted sutures with an atraumatic needle.

Five animals from each group were euthanized on days 3, 7, and 14 by exposure to CO_2 in a chamber (ZOONLAB, Germany). The selection of these time points was based on current concepts regarding the pathomorphological phases of wound healing [11]. After euthanasia, tissue samples from the wound area, including surrounding tissues with a 5-mm peripheral margin, were harvested for autopsy examination.

The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin (Biovitrum, Russia), rinsed in running water, dehydrated in graded alcohols and isopropanol (Biovitrum, Russia), and embedded in paraffin (Biovitrum, Russia). Then, we prepared histological sections 5 μm thick using a sliding microtome Leica SM 2010R (Leica, Germany) and stained with hematoxylin and eosin (Abris+, Russia).

Histological specimens were examined using a bright-field microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss, Germany; 10×, 40×, and 90× objective lenses; 10× eyepiece). In each group, we analyzed a total of 100 fields of view and assessed the following parameters: numerical density of altered arterioles and venules (with stasis, erythrocyte aggregation, and thrombosis) per 1 mm² of the section; the Kernogan index (an indicator of arteriolar conductance), calculated as the ratio of the arterial wall thickness to the radius of the vascular lumen; the pericapillary diffusion index (the area of tissue supplied by a single capillary), calculated as the ratio of the mean capillary diameter to the specific capillary area; and the arteriolar-venular ratio.

Image processing and morphometric analysis were performed using AxioVision Viewer 4.8 (Carl Zeiss, Germany) and ImageJ 1.52u (National Institutes of Health, USA) [12].

Specimens for electron microscopy were prepared by fixation in 2.5% glutaraldehyde in 0.2M cacodylate buffer (1:9), followed by postfixation in 1% OsO_4 at 4°C for 4 hours. After dehydration, the samples were embedded in an epoxy resin (Epon). Semi-thin sections were stained with Azure II, whereas ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The ultrastructure of endothelial cells of the microcirculatory vessels was then examined using a JEOL JEM-1400 CX transmission electron microscope (JEOL, Japan).

For immunohistochemical analysis, serial paraffin sections 4–6 μm thick were prepared and stained using rabbit recombinant polyclonal IgG antibodies against vascular endothelial growth factor A (VEGF-A; Abcam, USA). The slides were scanned using a Pannoramic MIDI III digital slide scanner (3DHISTECH, Hungary).

Subsequently, the number of VEGF-expressing cells per 1,000 cells was quantified using Pannoramic Diagnostic Scanner Software 2.1 (3DHISTECH, Hungary). Ten annotation areas were selected on each specimen, with a total area of 1 mm² analyzed per slide.

Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 software (StatSoft Inc., USA). The distribution of variables was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. We analyzed data with descriptive and nonparametric statistical methods and presented the studied parameters as the median and quartiles, M (Q1; Q3).

Comparisons between independent groups were performed using the Kruskal–Wallis test with Bonferroni correction, whereas those of related samples were carried out using the Wilcoxon test. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

Results

On day 3, all experimental groups exhibited structural abnormalities within the microcirculatory network at wound periphery, including arterioles, venules, and capillaries. These vessels were characterized by perivascular edema, vascular stasis, and erythrocyte aggregation (Fig. 1 A, B).

Intergroup analysis revealed no significant differences in the numerical density of altered arterioles per 1 mm² of section, which was 11.93 (10.89; 12.95; p=0.079). For altered venules, the numerical density per 1 mm² did not significantly differ between groups 1 and 2, whereas it was 2.15-fold lower in group 3 than in groups 1 and 2 (p=0.023).

Capillary numerical density was 1.2 times lower in groups 1 and 2 than in group 3 and the control group [p=0.036] (Table).

Reduced arteriolar conductance was observed in all experimental groups, as evidenced by a marked elevation of the Kernogan index. Compared with the control group, the index was 3.5, 2.4, and 1.9 times higher in groups 1, 2, and 3, respectively (p=0.0003, p=0.0183, p=0.0287). These observations indicate increased vascular wall tone and arteriolar lumen constriction. Furthermore, in group 3, it was 1.9-fold lower than in group 1 [p=0.035] (Table).

A three-fold reduction in the arteriolar-venular ratio was observed across all experimental groups compared with the control group [p=0.027] (Table), suggesting a pronounced inflow–outflow imbalance.

Similarly, the pericapillary diffusion index was significantly reduced across all experimental groups, falling 1.6-fold below control levels [p=0.039] (Table), indicating ongoing shortening of the diffusion distance and functional capillary immaturity.

Active angiogenesis was reflected by a significant increase in cellular VEGF expression. The highest expression levels were observed in groups 2 and 3, which were 17.4 and 2.4 times higher, respectively, than those in the control group and group 1 [p=0.015 and p=0.033, respectively] (Fig. 2 A, B; Table).

At the ultrastructural level, all experimental groups exhibited characteristic endothelial layer thinning, cytoplasmic vacuolization of endothelial cells, and disorganization of intercellular junctions. Micropinocytotic vesicles and plasmalemmal protrusions, reflecting active transcapillary exchange, were poorly expressed (Fig. 3 A).

On day 7, groups 2 and 3 demonstrated a tendency toward restoration of microcirculation in the wound area (Fig. 1 C).

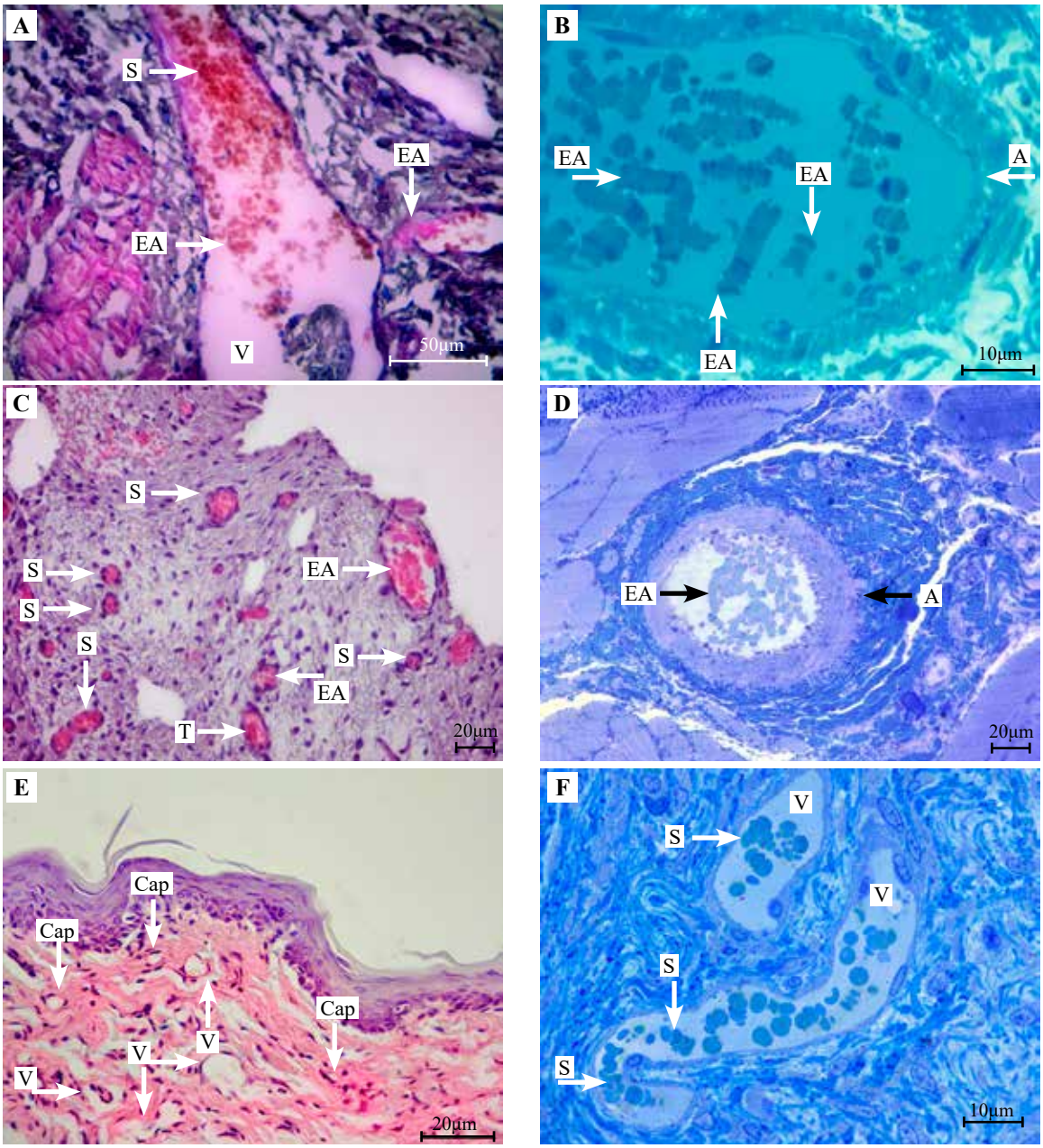


Fig. 1. Microscopic changes in the microcirculatory vessels during regeneration of an oral mucosa purulent wound.
A – pathologically changed vessels with signs of perivascular edema characteristic of all experimental groups. Day 3. B – arterial wall thickening and the presence of erythrocyte aggregation characteristic of all experimental groups. Day 3. C – pathologically changed microcirculatory vessels and vessels without signs of erythrocyte aggregation, stasis, and thrombosis. Group 2. Day 7. D – arteriole with a thickened vascular wall and the presence of erythrocyte aggregation in the vascular lumen. Group 1. Day 7. E – restored oral mucosa with vessels without pathological changes. Group 3. Day 14. F – erythrocyte aggregation in the venular lumen. Group 1. Day 14. A, C, E – H&E stain, ×400; B, D, F – Azure II staining, ×1,000
A – arteriole, V – venule, Cap – capillary, EA – erythrocyte aggregation, S – stasis, T – thrombosis

Рис 1. Микроскопические изменения сосудов микроциркуляторного русла при регенерации гнойной раны слизистой оболочки полости рта.
А – патологически измененные сосуды с признаками периваскулярного отека, характерные для всех экспериментальных групп. 3-и сутки исследования. В – утолщение артериальной стенки и наличие сладжа форменных элементов, характерное для всех экспериментальных групп. 3-и сутки. С – патологически измененные сосуды микроциркуляторного русла, а также сосуды без признаков сладжа, стаза и тромбоза. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки. D – артериола с утолщенной сосудистой стенкой и наличием сладжированных форменных элементов в просвете сосуда. 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки. Е – восстановленная слизистая оболочка полости рта с сосудами без патологических изменений. 3-я экспериментальная группа. 14-е сутки. F – сладж форменных элементов в просвете венулы. 1-я экспериментальная группа. 14-е сутки исследования. А, С, Е – окрашивание гематоксилином и эозином, ×400; В, D, F – окрашивание азуром II, ×1000
А – артериола, V – венула, Cap – капилляр, EA – агрегация эритроцитов, S – стаз, T – тромбоз

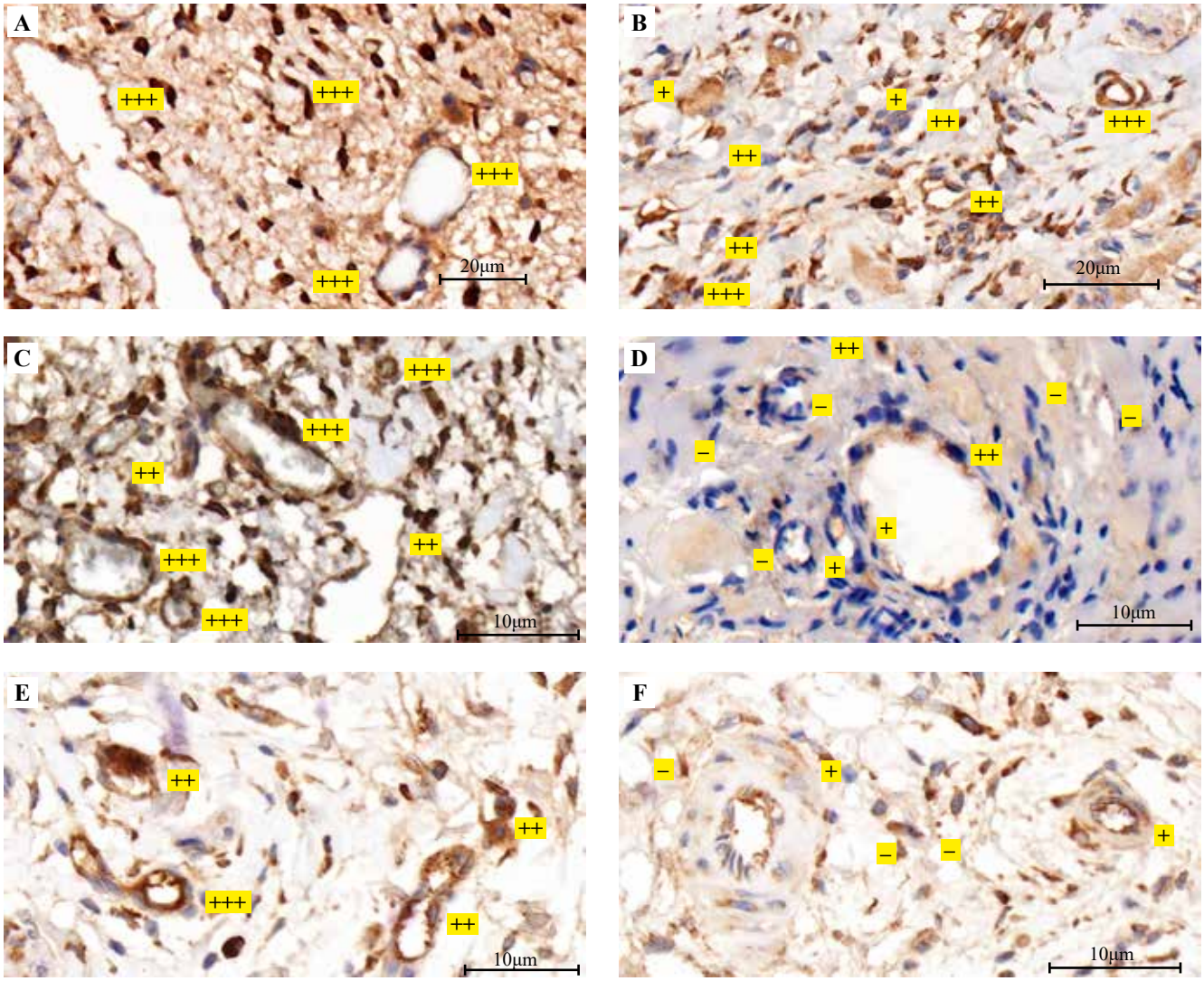


Fig. 2. VEGF expression in the area of purulent wound regeneration.
A – a pattern characteristic of groups 2 and 3. Day 3. B – group 1. Day 3. C – a pattern characteristic of groups 2 and 3. Day 7. D – group 1. Day 7. E – a pattern characteristic of groups 2 and 3. Day 14. F – group 1. Day 14. ×1,000
– – negative expression, + – weak expression, ++ – average expression, +++ – strong expression

Рис 2. Экспрессия VEGF в области регенерации гнойной раны.
A – картина, характерная для 2-й и 3-й экспериментальных групп. 3-и сутки исследования. B – 1-я экспериментальная группа. 3-и сутки исследования. C – картина, характерная для 2-й и 3-й экспериментальных групп. 7-е сутки исследования. D – 1-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. E – картина, характерная для 2-й и 3-й экспериментальных групп. 14-е сутки исследования. F – 1-я экспериментальная группа. 14-е сутки исследования. ×1000
– – отсутствие экспрессии, + – слабая экспрессия, ++ – средняя экспрессия, +++ – сильная экспрессия

Compared with day 3, a significant decrease in the numerical density of altered arterioles and venules was observed across all experimental groups. In group 3, the reduction in the parameter was substantially greater than in group 1 (3.2- and 2-fold, respectively; p=0.034; p=0.041).

On day 3, groups 2 and 3 showed the arteriolar-venular ratio to be 1.7 times higher than in group 1 [p=0.0005; p=0.0004] (Fig. 1 D), indicating partial correction of inflow–outflow imbalance, and remained significantly lower than control values [p=0.003; p=0.004] (Table).

Compared with day 3, a significant reduction in the Kernogan index was observed in all experimental groups. In group 3, it was 1.8 and 1.4 times lower than in groups 1 and 2, respectively, although control levels were not attained (p=0.027).

The pericapillary diffusion index did not differ significantly between the experimental groups (p=0.077) but remained 1.7-fold below control values [p=0.036] (Table).

VEGF expression in groups 2 and 3 did not change significantly [p=0.066; p=0.059] (Fig. 2 C), whereas

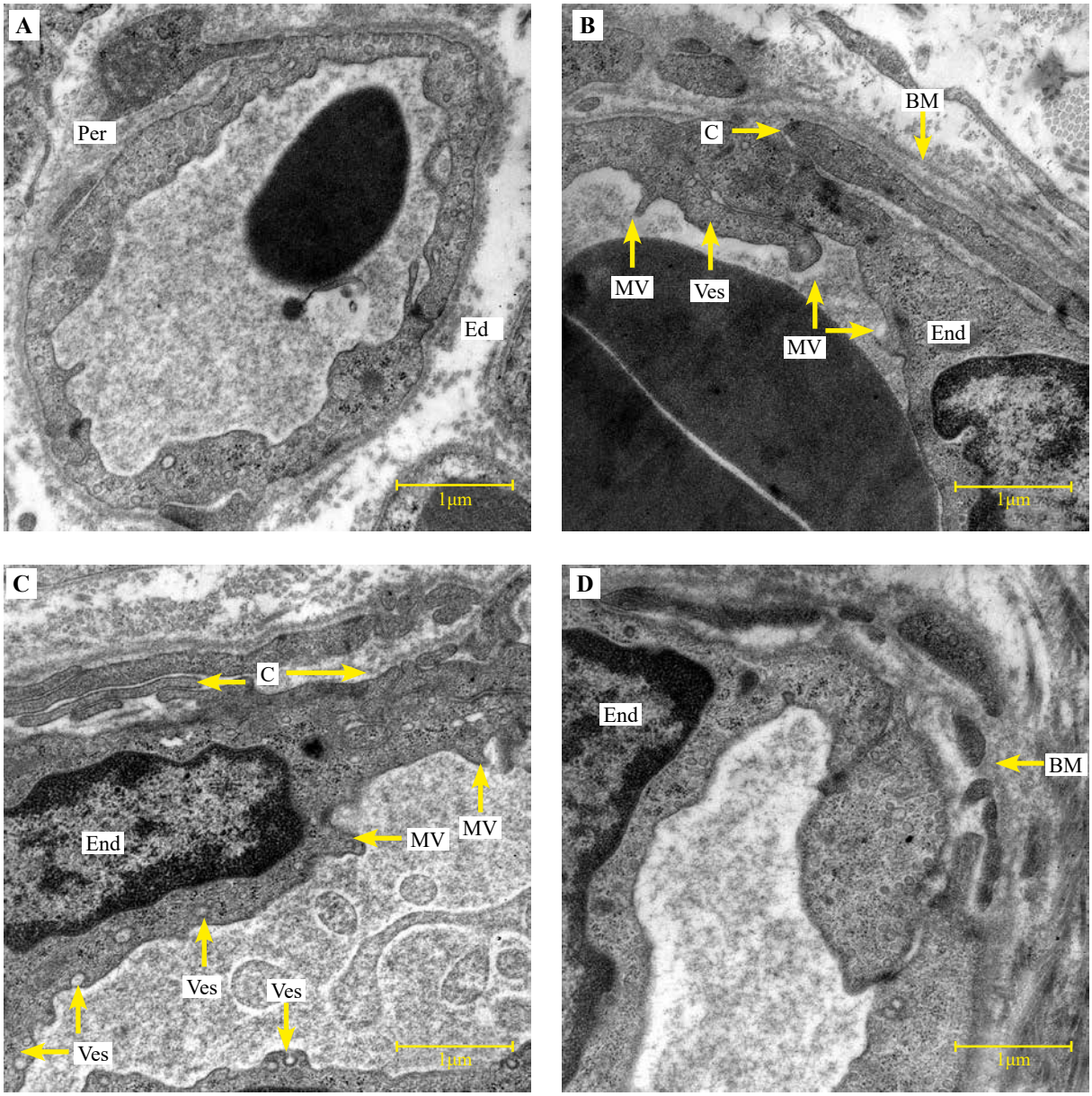


Fig. 3. Ultrastructural changes in the microcirculatory vessels in the area of purulent wound regeneration in the oral mucosa.
A – a vessel with perivascular edema, endothelial layer thinning, and signs of impaired transcapillary exchange. A pattern characteristic of all experimental groups. Day 3. B – gradual restoration of intercellular contacts and transcapillary exchange in the microcirculatory vessels bed in groups 2 and 3. Group 2. Day 7. C – restoration of intercellular contacts and signs of active transcapillary exchange in microcirculatory vessels. Group 3. Day 14. D – disorganization of cellular contacts, impaired transcapillary exchange, and irregularity of the basement membrane in microcirculatory vessels. Group 1. Day 14. ×20,000
End – endothelial cells, Per – pericytes, MV – plasmalemmal protrusions, Ves – micropinocytic vesicles, BM – basement membrane, C – intercellular contacts, Ed – perivascular edema

Рис 3. Ультраструктурные изменения сосудов микроциркуляторного русла в области регенерации гнойной раны слизистой оболочки полости рта.
A – сосуд с периваскулярным отеком и истончением эндотелиального слоя, признаками нарушения транскапиллярного обмена. Картина, характерная для всех экспериментальных групп. 3-и сутки исследования. B – постепенное восстановление межклеточных контактов и транскапиллярного обмена в сосудах микроциркуляторного русла в группах со смарт-мембраной. 2-я экспериментальная группа. 7-е сутки исследования. C – восстановление межклеточных контактов, признаки активного транскапиллярного обмена в сосудах микроциркуляторного русла в группах со смарт-мембраной. 3-я экспериментальная группа. 14-е сутки исследования. D – дезорганизация клеточных контактов, нарушение транскапиллярного обмена, неравномерность базальной мембраны в сосудах микроциркуляторного русла. 1-я экспериментальная группа. 14-е сутки исследования. ×20 000
End – эндотелиоциты, Per – перициты, MV – выросты плазмолеммы, Ves – микропиноцитозные пузырьки, BM – базальная мембрана, C – межклеточные контакты, Ed – периваскулярный отек

Table | Таблица

Morphological indicators of microcirculatory changes in the area of purulent wound healing, Me (Q1–Q3) | Морфологические показатели изменения микроциркуляции в области заживления гнойной раны, Me (Q1–Q3)

	Numerical density of changed arterioles | Численная плотность измененных артериол	Numerical density of changed venules | Численная плотность измененных венул	Numerical density of capillaries | Численная плотность капилляров	Arteriolar-venular ratio | Артериоло-венулярное взаимоотношение	Kernogan index | Индекс Керногана	Pericapillary diffusion index | Индекс перикапиллярной диффузии	VEGF, %
Control | Контроль	–	–	192.7 (188.9; 197.1)	0.72 (0.68; 0.75)	0.39 (0.35; 0.43)	7.8 (7.4; 8.3)	1.5 (1.3; 2.1)
Day 3 | 3-и сутки							
Group 1 | 1-я группа	11.93 (10.89; 12.95)*	24.22 (22.34; 26.78)*&	161.48 (152.52; 169.52)*	0.22 (0.20; 0.23)*	1.38 (1.27; 1.53)*&	5.3 (5.0; 45.5)*	11.0 (10.2; 11.5)*#&
Group 2 | 2-я группа	9.33 (8.88; 10.05)*	19.49 (17.97; 21.82)*	167.8 (159.54; 177.37)*	0.24 (0.24; 0.29)*	0.96 (0.85; 1.10)*	5.4 (5.1; 5.5)*	25.6 (23.4; 26.8)*
Group 3 | 3-я группа	11.02 (10.66; 12.48)*	11.02 (10.04; 12.53)*	174.8 (166.57; 176.24)	0.27 (0.24; 0.30)*	0.74 (0.64; 0.81)*	4.8 (4.1; 5.3)*	26.2 (16.9; 27.9)*
Day 7 | 7-е сутки							
Group 1 | 1-я группа	29.6 (21.7; 32.8)*&	27.2 (21.5; 32.9)*&	216.6 (213.5; 218.8)	0.3 (0.2; 0.3)*#&	0.9 (0.8; 1.0)*&	4.1 (4.0; 4.4)*	4.5 (2.8; 5.1)*#&
Group 2 | 2-я группа	18.1 (17.8; 18.3)*	18.1 (17.7; 18.7)*	219.5 (215.9; 230.8)	0.5 (0.4; 0.5)*	0.7 (0.6; 0.7)*&	4.6 (4.0; 4.7)*	18.1 (15.2; 20.6)*
Group 3 | 3-я группа	9.1 (8.9; 11.2)*	13.3 (8.9; 17.8)*	215.1 (212.7; 219.5)	0.5 (0.4; 0.6)*	0.5 (0.5; 0.6)*	4.6 (4.2; 5.4)*	22.7 (19.8; 22.8)*
Day 14 | 14-е сутки							
Group 1 | 1-я группа	19.9 (18.7; 19.1)*&	20.0 (19.4; 26.8)*	202.4 (184.9; 215.1)	0.56 (0.51; 0.68)*	0.6 (0.5; 0.7)*#&	8.2 (7.5; 8.8)	1.2 (0.9; 1.6)#&
Group 2 | 2-я группа	–	9.6 (9.5; 9.8)*	196.9 (188.9; 209.1)	0.77 (0.61; 0.87)	0.37 (0.35; 0.43)	8.2 (7.3; 8.6)	4.2 (3.8; 4.7)*&
Group 3 | 3-я группа	–	–	198.1 (187.3; 215.7)	0.75 (0.68; 0.77)	0.39 (0.35; 0.40)	7.8 (7.4; 8.3)	8.7 (7.1; 9.9)*

* – significant differences compared with the control group ($p<0.05$) | достоверные отличия с контрольной группой ($p<0,05$)
# – significant differences compared with group 2 ($p<0.05$) | достоверные отличия со 2-й группой ($p<0,05$)
& – significant differences compared with group 3 ($p<0.05$) | достоверные отличия с 3-й группой ($p<0,05$)

in group 1, it demonstrated a 2.5-fold decrease [p=0.0002] (Fig. 2 D) compared with day 3 (Table).

On day 7, in group 1, ultrastructural examination of vessels revealed persistence of the pathological and morphological changes that had been observed on day 3.

In contrast, in groups 2 and 3, we noted a gradual restoration of the endothelial layer of capillaries. Endothelial cells demonstrated a more ordered orientation, and the severity of cytoplasmic edema decreased. However, signs of functional immaturity persisted, including uneven thickness of the endothelial layer, partial disruption of intercellular junctions, and poorly expressed micropinocytotic vesicles and plasmalemmal protrusions (Fig. 3 B).

On day 14, morphologically mature elements of the microcirculatory bed surrounded by well-developed connective tissue were identified in groups 2 and 3 (Fig. 1 E). At the same time, active angiogenesis persisted, as evidenced by a significant increase in VEGF expression, which was 2.8- and 5.8-fold higher in groups 2 and 3 compared with the control group, respectively [p=0.0287; p=0.0001] (Fig. 2 E; Table).

In group 3, the Kernogan index, the pericapillary diffusion index, and arteriolar-venular ratio reached values comparable to those of the control group, indicating restoration of microcirculation in the wound area. In addition, a complete disappearance of altered arterioles and venules was observed in group 3, in contrast to groups 1 and 2. In group 2, despite an overall positive trend, altered venules were still detected, with a numerical density of 9.6 (9.5; 9.8) per 1 mm² of the section. However, this value showed a 1.9-fold decline compared with day 7 (p=0.029) and a 2.1-fold drop compared with group 1 [p=0.017] (Table).

Ultrastructural examination of groups 2 and 3 revealed numerous micropinocytotic vesicles and plasmalemmal protrusions in capillary endothelial cells, along with dense intercellular junctions and a well-formed basement membrane (Fig. 3 C).

In group 1, despite partial restoration of the pericapillary diffusion index, the Kernogan index remained 1.5-fold higher (p=0.0027), while the arteriolar-venular ratio was 1.3-fold lower (p=0.035) than in the control group. VEGF levels returned to those observed in the control group, representing a 2.8-times reduction compared with group 2 and 5.8-times compared with group 3 [p=0.0287 and p=0.0001, respectively] (Fig. 2 F). Persistent alterations in vessels, including stasis, erythrocyte aggregation, and thrombosis, were still detectable (Fig. 1 F).

Ultrastructural analysis showed that group 1 maintained signs of structural and functional insufficiency. We detected areas of endothelial layer thinning, persisting perivascular edema, partially restored intercellular junctions, and poorly expressed micropinocytotic vesicles and plasmalemmal protrusions (Fig. 3 D). Endothelial cells were arranged in a less orderly manner compared with groups 2 and 3.

Discussion

The morphological changes of the microcirculatory bed identified on day 3 of experimental modeling of a purulent oral wound reflected typical features of the acute inflammatory phase. This phase was accompanied by arterial spasm, endothelial dysfunction, and aggregation of blood cellular elements, which lead to making some vessels non-functional. Morphometrically, this was manifested by an increase in the numerical density of altered vessels [13]. More pronounced changes were observed in the group with no wound dressing used (group 1), indicating severe hemodynamic disturbances.

An increase in the Kernogan index in all experimental groups reflected a decrease in the patency of arterioles and impairment of arterial blood inflow due to lumen narrowing and vascular wall thickening. All these processes were caused by inflammatory edema, activation of smooth muscle cells, and biological activity of inflammatory mediators [14].

Changes in the venular component of the microcirculation were characterized by an increase in the numerical density of morphologically altered venules and a decrease in the arteriolar-venular ratio, indicating an inflow–outflow imbalance. Due to increased permeability and lower resistance to inflammatory influence, venules were the first to be involved, which led to the development of venous stasis and aggravation of tissue hypoxia in the affected area [15].

The formation of new microcirculatory elements was evidenced by a significant increase in VEGF expression in the cells surrounding the wound defect. This finding coincided with marked cellular infiltration, indicating the activation of angiogenic mechanisms in the presence of inflammation [16]. In addition, a significant decrease in the pericapillary diffusion index across all groups and pathological ultrastructural changes indicated functional immaturity of the capillary bed [17].

On day 7, the observed improvement in the microcirculatory bed organization reflected the transition of the wound healing from the acute inflammatory to the proliferative phase with active angiogenesis [13]. In particular, a significant decrease in the numerical density of altered arterioles and venules per 1 mm² section in group 3 was associated with a reduction in the severity of the inflammatory response, decreased microbial load, and stabilization of endothelial function. Group 1 exhibited persistent marked morphological alterations, namely thrombosis, edema, and an increased Kernogan index, which indicated sustained exposure to inflammatory mediators and impaired recovery of the arterial portion of the microcirculation. A rise in the numerical density of altered arterioles on day 7 in group 1 (29.6 versus 11.93 on day 3) is attributed to secondary deterioration of microcirculation due to persistently high microbial load and transition to chronic inflammation. This is not an artifact, but rather a characteristic feature of an open purulent process without wound dressing [18].

VEGF expression increase in groups 2 and 3 reflected activation of angiogenesis characteristic of the proliferative stage of wound healing; however, ultrastructural signs of functional immaturity of newly formed vessels were still observed. In group 1, a plunge in VEGF expression was detected, which reflected the formation of poorly vascular-

ized connective tissue that would later contribute to cicatrix deformation at the wound site [16].

Complete restoration of the structural and functional organization of the microcirculatory bed in the group 3 by day 14 was due to the combined effect of local antimicrobial control and favorable conditions for reparative tissue regeneration. Local release of the antibacterial agent from the smart membrane reduced microbial contamination, which led to attenuation of the inflammatory response. This, in turn, contributed to stabilized endothelial function, reduced vascular permeability and perivascular edema, thereby promoting the restoration of hemodynamics and vascular patency [17].

Control of the bacterial load in the wound area limited coagulation cascade activation and reduced blood cell adhesion to the endothelium. Subsequently, altered arterioles and venules disappeared completely, and arteriolar-venular ratio was restored. As inflammation subsided, coordinated angiogenesis proceeded under more favorable conditions with a more orderly spatial organization of endothelial cells, a lower incidence of ultrastructural immature capillaries, and restoration of the pericapillary diffusion index. As a result, functionally adequate angiogenesis ensured sufficient perfusion of regenerating tissues, which accelerated the transition of wound healing from the inflammatory to proliferative and remodeling phases [18].

In addition, the presence of a wound dressing itself served as a barrier limiting secondary microbial contamination and mechanical trauma to the wound surface, which maintained stable microenvironmental homeostasis in the defect area, reduced ischemic-hypoxic stress, and contributed to a more coordinated restoration of microvascular network [19]. Thus, by day 14, we observed that the values of almost all investigated parameters in group 2 returned to control values.

An elevated Kernogan index and a reduced pericapillary diffusion index in group 1 on day 14 indicated persistent elevation of vascular tone and structural remodeling of the vascular wall, even when capillary blood flow relatively normalized [14].

The major limitation of our research is a relatively small number of animals per group and time point (n=15 and n=5, respectively). Nevertheless, statistically significant differences were detected, suggesting a large effect size. To increase statistical power, future studies will use larger sample sizes.

Conclusion

Applying the antibacterial piezoelectric polymer smart membrane promoted wound healing by controlling microbial contamination and indirectly restoring the microcirculatory bed through improved endothelial function, hemodynamics, and angiogenic processes. The observed morphological and morphometric changes indicated the formation of a functionally mature vascular network within a shorter timeframe compared with the groups treated without any wound dressing and with the piezoelectric polymer smart membrane without antibacterial agent.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – S.A. Sagdullaeva, A.D. Koniaeva, E.Yu. Varakuta, E.N. Bolbasov.
Collected the data and performed the analysis – S.A. Sagdullaeva, O.V. Kukartseva, U.V. Chernova.
Data analysis – S.A. Sagdullaeva.
Wrote the paper – A.D. Koniaeva.
Edited the manuscript – E.Yu. Varakuta, E.N. Bolbasov.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – С.А. Сагдуллаева, А.Д. Коняева, Е.Ю. Варакута, Е.Н. Больбасов.
Сбор и обработка материала – С.А. Сагдуллаева, О.В. Кукарцева, У.В. Чернова.
Анализ данных – С.А. Сагдуллаева.
Написание текста – А.Д. Коняева.
Редактирование – Е.Ю. Варакута, Е.Н. Больбасов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References/Литература

1. *Komilovich MJ.* Purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial region in patients with various chronic diseases. Indonesian Journal of Innovation Studies. 2022;18:637. DOI: 10.21070/ijins.v18i.637.
2. *Kamel NA.* Bio-piezoelectricity: fundamentals and applications in tissue engineering and regenerative medicine. Biophys Rev. 2022;14(3):717–33. DOI: 10.1007/s12551-022-00969-z.
3. *Dai J, Shao J, Zhang Y, Hang R, Yao X, Bai L et al.* Piezoelectric dressings for advanced wound healing. J Mater Chem B. 2024;12(8):1973–90. DOI: 10.1039/d3tb02492j.
4. *Das R, Le TT, Schiff B, Chorsi MT, Park J, Lam P et al.* Biodegradable piezoelectric skin-wound scaffold. Biomaterials. 2023;301:122270. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2023.122270.
5. *Goonoo N, Gimié F, Ait-Arsa I, Cordonin C, Andries J, Jhurry D et al.* Piezoelectric core-shell PHBV/PDX blend scaffolds for reduced superficial wound contraction and scarless tissue regeneration. Biomater Sci. 2021;9(15):5259–74. DOI: 10.1039/d1bm00379h.
6. *Rashdan HRM, Tolba E, Abdelraof M.* Cotton gauze wound-dressing patches loaded with dapsone derivative and silver nanoparticles for promoting wound healing via antibacterial acceleration function. RSC Adv. 2025;15(56):48156–70. DOI: 10.1039/d5ra04951b.
7. *Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov EN, Stankevich KS.* Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane. Clinical and experimental morphology. 2022;11(3):56–66. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.56-66.
8. *Chernova UV, Tran TH, Bolbasov EN.* Piezoelectric properties of polymer composite membranes with antimicrobial properties for oral mucosal regeneration. In: Proceedings of the II International Siberian Chemical Symposium "SCS-2025" (Tomsk, 20-24 Oct 2025). Tomsk: TPU Publ., 2025. P. 291–292 (In Russ.). Available from: http://earchive.tpu.ru/handle/11683/133669 (accessed 17.03.2026).
9. *Scardina GA, Carini F, Noto F, Messina P.* Microcirculation in the healing of surgical wounds in the oral cavity. Int J Oral Maxillofac Surg. 2013;42(1):31–5. DOI: 10.1016/j.ijom.2012.06.008.

10. *Kalalinia F, Taherzadeh Z, Jirofti N, Amiri N, Foroghinia N, Beheshti M et al.* Evaluation of wound healing efficiency of vancomycin-loaded electrospun chitosan/poly ethylene oxide nanofibers in full thickness wound model of rat. Int J Biol Macromol. 2021;177:100–10. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.209.
11. *Garraud O, Hozzein WN, Badr G.* Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches? BMC Immunol. 2017;18(Suppl 1):23. DOI: 10.1186/s12865-017-0207-y.
12. *Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ.* Image processing with ImageJ. Biophotonics International. 2003;11(7):36–42. Available from: https://www.researchgate.net/publication/228334776_Image_Processing_with_ImageJ (accessed 17.03.2026).
13. *Mayrovitz HN, Aoki K.* Microcirculation in wound healing. In: RF Tuma, JW Breslin, S Peirce-Cottler, WL Murfee (eds.). Handbook of microcirculation. Physiology in health and disease. Cham: Springer, 2023. P. 517–551. DOI: 10.1007/978-3-031-99609-2_10.
14. *Zanoli L, Briet M, Empana JP, Cunha PG, Mäki-Petäjä KM, Protogerou AD et al.* Vascular consequences of inflammation: a position statement from the ESH Working Group on Vascular Structure and Function and the ARTERY Society. J Hypertens. 2020;38(9):1682–98. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002508.
15. *Pronina OM, Bilash SM, Kobeniak MM, Koptev MM, Pirog-Zakaznikova AV, Onipko VV et al.* Morphometric features of the structural components of the hemomicrocirculatory bed in the perivulnar region of the caecum in wound defect sutured with polyfilament suture material. Wiad Lek. 2021;74(6):1382–88. PMID: 34159924.
16. *Palomeque Chávez JC, McGrath M, O'Connor C, Dervan A, Dixon JE, Kearney CJ et al.* Development of a VEGF-activated scaffold with enhanced angiogenic and neurogenic properties for chronic wound healing applications. Biomater Sci. 2025;13(8):1993–2011. DOI: 10.1039/d4bm01051e.
17. *Peng S, Wang L, Lu Z, Yang X, Lu Y, Wang Z et al.* An injectable conductive multifunctional hydrogel dressing with synergistic antimicrobial, ROS scavenging, and electroactive effects for the combined treatment of chronic diabetic wounds. Biomater Adv. 2026;179:214498. DOI: 10.1016/j.bioadv.2025.214498.
18. *He J, Chen J, Liu T, Qin F, Wei W.* Research progress of multifunctional hydrogels in promoting wound healing of diabetes. Int J Nanomedicine. 2025;20:7549–78. DOI: 10.2147/IJN.S519100.
19. *Huang Y, Song C, He J, Li M.* Research progress in endothelial cell injury and repair. Front Pharmacol. 2022;13:997272. DOI: 10.3389/fphar.2022.997272.

Author information

Sofia A. Sagdullaeva – Teaching Assistant, Human Anatomy Department with a course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University.
https://orcid.org/0000-0002-5730-3411

Anastasiia D. Koniaeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Human Anatomy Department with a course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University.
https://orcid.org/0000-0002-9708-1948

Elena Yu. Varakuta – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Human Anatomy Department with a course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University.
https://orcid.org/0000-0003-3173-5336

Evgeny N. Bolbasov – Cand. Sci. (Tech.), Head of Shared Access Additive Technology Center, National Research Tomsk Polytechnic University.
https://orcid.org/0000-0002-6113-1835

Ulyana V. Chernova – Engineer, School of Advanced Engineering "Intelligent Energy Systems", National Research Tomsk Polytechnic University.
https://orcid.org/0000-0002-6714-8785

Oksana V. Kukartseva – Engineer, Shared Access Additive Technology Center, National Research Tomsk Polytechnic University.
https://orcid.org/0009-0007-1559-199X

Информация об авторах

Софья Андреевна Сагдуллаева – ассистент кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии СибГМУ.

Анастасия Денисовна Коняева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии СибГМУ.

Елена Юрьевна Варакута – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии СибГМУ.

Евгений Николаевич Больбасов – кандидат технических наук, директор Центра аддитивных технологий общего доступа НИ ТПУ.

Ульяна Вадимовна Чернова – инженер Инженерной школы «Интеллектуальные энергетические системы» НИ ТПУ.

Оксана Васильевна Кукарцева – инженер Центра аддитивных технологий общего доступа НИ ТПУ.

© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.56-66 УДК: 616.71-018.3-002:616-092.4:678.5/.8:616-74

Экспериментальное исследование имплантатов для хондропластики на основе поликапролактона и многокомпонентной сополимерной системы

Н.О. Белов[1], А.Л. Потапов[2], А.С. Курьянова[1,3], С.Г. Раденска-Лоповок[1,4], Т.С. Демина[1,5], Д.А. Погосян[1], Ю.М. Ефремов[1], Е.Б. Калинский[1], П.С. Тимашев[1], А.В. Лычагин[1]

[1] ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия
[2] ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия
[3] ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия
[4] ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия
[5] ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Повреждение хряща коленного сустава − часто встречающаяся полиэтиологическая патология, приводящая к хроническим дегенеративно-дистрофическим изменениям. Низкий регенераторный потенциал ткани предопределяет необходимость применения хирургических методов лечения, в том числе по методике индуцированного на матрице аутохондрогенеза с использованием высокотехнологичных имплантатов. Цель работы − изучить регенерацию суставного хряща под воздействием имплантата на основе нетканого материала при экспериментальном остром остеохондральном повреждении.

Материалы и методы. Нами созданы имплантаты из микроволокнистого нетканого материала на базе поликапролактона и многокомпонентной сополимерной системы (полилактид/поликапролактон/хитозан/олиголактид/желатин). Их физико-химические свойства анализировали при помощи сканирующей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии, контактного угла смачивания, индентационного тестирования. *In vivo* моделировали остеохондральные дефекты дистального эпифиза бедренной кости у крыс линии Вистар, проводили хондропластику по методике индуцированного на матрице аутохондрогенеза. Полученные после имплантации изделий образцы исследованы гистологическим и морфометрическим методами.

Результаты. Волокна материала имели средний диаметр 5±3 мкм, обладали гидрофобной поверхностью. При вживлении формировавшаяся ткань соответствовала молодой незрелой хрящевой, отличающейся от суставного хряща. Медиана показателя оценки по шкале O'Driscoll − 19 баллов к заключительным срокам наблюдения.

Заключение. Многокомпонентные имплантаты на основе синтетических и природных полимеров поддерживают процесс регенерации в зоне дефекта. Тем не менее репарация происходит преимущественно за счет формирования фиброзного хряща.

Ключевые слова: сополимер, поликапролактон, нетканый материал, электроформование, суставной хрящ, регенерация хряща

Для корреспонденции: Никита Олегович Белов. E-mail: belov.n.o@yandex.ru

Для цитирования: Белов Н.О., Потапов А.Л., Курьянова А.С., Раденска-Лоповок С.Г., Демина Т.С., Погосян Д.А., Ефремов Ю.М., Калинский Е.Б., Тимашев П.С., Лычагин А.В. Экспериментальное исследование имплантатов для хондропластики на основе поликапролактона и многокомпонентной сополимерной системы. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):56–66. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.56-66.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 04.06.2026. **Получена после рецензирования** 10.06.2026. **Принята в печать** 22.06.2026.

Experimental study of chondroplasty scaffolds based on polycaprolactone and a multicomponent copolymer system

N.O. Belov[1], A.L. Potapov[2], A.S. Kuryanova[1,3], S.G. Radenska-Lopovok[1,4], T.S. Demina[1,5], D.A. Pogosyan[1], Yu.M. Efremov[1], E.B. Kalinsky[1], P.S. Timashev[1], A.V. Lychagin[1]

[1] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia
[2] Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
[3] N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia
[4] Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia
[5] Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Articular cartilage damage in the knee is a common polyethological pathology leading to chronic degenerative-dystrophic changes in the articular cartilage. Low regenerative capacity of the tissue determines the employment of surgical treatments, including the autologous matrix-induced chondrogenesis using high-tech scaffolds. The paper aimed to study articular cartilage regeneration following implantation of a nonwoven scaffold in experimental acute osteochondral injury.
Materials and methods. Scaffolds were fabricated from microfiber nonwoven mats based on polycaprolactone and a multicomponent copolymer system (polylactide/polycaprolactone/chitosan/oligolactide/gelatin); their physico-chemical properties were studied by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, contact angle of wetting, and indentation testing. Osteochondral defects of the femur distal epiphysis were modeled in vivo in Wistar rats followed by chondroplasty using the autologous matrix-induced chondrogenesis. The samples obtained after implantation were examined with histological and morphometric methods in order to study the features of articular cartilage regeneration.
Results. The material fibers averaged 5±3 μm in diameter and had a hydrophobic surface. Following implantation, the newly formed tissue resembled immature cartilage and was different from native articular cartilage. The median score on the O'Driscoll scale was 19 points by the end of the follow-up period.
Conclusion. Multicomponent scaffolds based on synthetic and natural polymers support regeneration in the area of articular cartilage defect. However, repair occurs mainly through the formation of fibrous cartilage.

Keywords: copolymer, polycaprolactone, nonwoven mat, electrospinning, articular cartilage, cartilage regeneration

Corresponding author: Nikita O. Belov. E-mail: belov.n.o@yandex.ru

For citation: Belov N.O., Potapov A.L., Kuryanova A.S., Radenska-Lopovok S.G., Demina T.S., Pogosyan D.A., Efremov Yu.M., Kalinsky E.B., Timashev P.S., Lychagin A.V. Experimental study of chondroplasty scaffolds based on polycaprolactone and a multicomponent copolymer system. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):56–66 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.56-66.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).
Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.
Received 04.06.2026. **Received in revised form** 10.06.2026. **Accepted** 22.06.2026.

Введение

Повреждение хряща коленного сустава − значимая патология, являющаяся частой причиной болей и нарушения двигательной функции, встречающаяся в 14−26% случаев наблюдений [1].

Она носит полиэтиологический характер. Среди причин отмечают травматическое воздействие, рассекающий остеохондрит, спонтанный остеонекроз, хронические дегенеративные изменения. По времени возникновения повреждения хряща разделяются на острые (до 3 недель с момента травмы) и хронические [2]. Несмотря на локальный характер, наличие воспалительной реакции предопределяет развитие комплексных изменений гомеостаза сустава в целом. Прогрессирующий остеоартрит приводит к нарушению баланса между катаболическими и анаболическими процессами, способствует распаду коллагена и протеогликанов внеклеточного матрикса (ВКМ), а также снижению синтетической функции хондроцитов, провоцируя дальнейшие дегенеративные изменения гиалиновой хрящевой ткани во всем суставе [3].

При локальных дефектах суставного хряща вариант регенерации ткани напрямую связан со степенью их глубины. При наличии неполнослойного дефекта его полного восстановления не наблюдается. Отмечается временная компенсаторная реакция, проявляющаяся усилением пролиферации хондроцитов в области краев дефекта и увеличением синтеза компонентов ВКМ хондроцитами. Низкий потенциал регенерации предопределен тем, что миграция хондроцитов, заключенных в плотный ВКМ, к зоне повреждения невозможна,

а источник потенциальной миграции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) отсутствует [4].

Полнослойные дефекты хряща с вовлечением субхондральной кости регенерируют путем формирования фиброзного хряща как за счет миграции МСК костного мозга непосредственно к локализации повреждения, так и за счет образования фибринового сгустка, способствующего фиксации и дальнейшей пролиферации МСК. Строение и биомеханические свойства фиброзного хряща и гиалинового хряща отличаются [4].

Учитывая заведомо низкий регенераторный потенциал суставного хряща, очевидна потребность в лечении в виде хирургических органосохраняющих операций. Эффективным способом восстановления локальных дефектов хряща крупных суставов является методика индуцированного на матрице аутохондрогенеза (autologous matrix-induced chondrogenesis, AMIC). Она сочетает в себе возможности методики стимуляции костного мозга в комбинации с применением высокотехнологичных имплантатов, способствующих удержанию сформировавшегося суперсгустка, который представлен фибрином, МСК и факторами роста, поступающими в зону повреждения из субхондральной кости [5]. Импланты должны способствовать фиксации клеток, заполнению и стабилизации зоны повреждения и обеспечивать их механическую защиту [6].

Наиболее широко применяется для хондропластики по методике AMIC имплантат Chondro-Gide, созданный на основе коллагена I/III типа, демонстрирующий удовлетворительные долгосрочные результаты использования [7]. Тем не менее его применение может быть ограничено гиперчувствительностью к компонентам в его составе [8]. С целью создания новых перспективных имплантатов с более совершенными свойствами задействуются материалы на основе полимеров природного, синтетического происхождения и их комбинации, воссоздаются различные принципы архитектоники изделий (мембраны, гидрогели, микроволокнистые нетканые материалы), а также исследуются разные способы производства [9, 10].

Материалы и методы

Получение нетканых материалов. Для имплантатов использована многокомпонентная сополимерсодержащая система полилактид/поликапролактон/хитозан/олиголактид/желатин (ППХОЖ), которая была синтезирована и охарактеризована нами ранее [11]. Мы создали гибридный материал на основе системы ППХОЖ и поликапролактона (ПКЛ). В качестве формовочного использовали 30 мас.% раствор смеси ПКЛ/ППХОЖ (9:1 г/г) в хлороформе. Для получения микроволокнистых материалов методом электроформования использовали лабораторную установку ESR100D (NanoNC, Южная Корея). Полимерные составы подавали из пластикового шприца объемом 12 мл через иглу с внутренним диаметром 0,413 мм; скорость подачи раствора 1,5 мл/ч. Расстояние между иглой и заземленным статическим коллектором (стальной пластиной 300×300 мм) составляло 200–240 мм; напряжение 25 кВ. Процесс проводили при комнатной температуре и влажности не более 50%. Имплантаты имели толщину около 150–200 мкм.

Морфологические и физико-химические свойства нетканых материалов имплантата. Морфологию имплантатов изучали с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Zeiss EVO LS10 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Средний диаметр волокон и их распределение по размерам оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ v. 1.52 (NIH, США). Химический состав поверхности исследовали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии в режиме многократного нарушенного полного внутреннего отражения (ИК-МНПВО-спектроскопия) на установке Spectrum Two (PerkinElmer, США). Свойства поверхности оценивали, определяя контактный угол смачивания (Θ) приемом сидящей капли с помощью установки Acam-MSC01 (Apex Instruments, Индия). В качестве рабочей жидкости использовали деионизованную воду. Проводили 3-кратные измерения, выполненные на разных участках полимерных материалов в течение 20 минут после фиксации капли воды, и рассчитывали среднее значение Θ. Механические свойства материала анализировали во влажном состоянии (инкубировали в фосфатно-солевом буфере 24 часа) с использованием универсальной механической измерительной системы Mach-1 v500csst (Biomomentum, Канада). Прочность на разрыв, относительное удлинение при разрыве и модуль Юнга измеряли при одноосном растяжении не менее трех образцов (форма «собачьей кости», размер 40×10 мм) и рассчитывали их средние значения.

Экспериментальная модель исследования. Экспериментальное пилотное исследование проводилось в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986), одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского университета (протокол № 09-24 от 03.04.2024). Для проведения эксперимента использовали самцов крыс линии Вистар, достигших половой и скелетной зрелости (от 4 месяцев, масса 300–500 граммов). Определение размера выборки осуществляли по методу уравнения ресурсов Мида. Животные случайным образом были разделены на две группы (по 15 особей в каждой): в 1-й группе выполнялось воссоздание остеохондрального дефекта без применения имплантатов, во 2-й группе происходило то же, но с последующей имплантацией. Животных выводили из эксперимента в сроки 7, 60 и 120 дней по пять особей для каждой группы. В ходе оперативных вмешательств воссоздавали остеохондральные дефекты критического размера в частично нагружаемой зоне суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости в проекции межмыщелковой борoз-

ды [12]. После общей анестезии (золетил 100–40 мг/кг в комбинации с ксилазином – 10 мг/кг) выполняли медиальную парапателлярную артротомию, воспроизводили остеохондральный хрящевой дефект критического размера в частично нагружаемой зоне диаметром 1,9 мм в проекции межмыщелковой вырезки бедренной кости (рис. 1). Фиксацию имплантата размерами 2 мм проводили по методу пресс-фит и ушивали послеоперационную рану. В послеоперационном периоде животным проводили медикаментозную анальгетическую терапию (кетопрофен 5 мг/кг подкожно 1 раз в сутки в течение 7 дней) и антибиотикопрофилактику (энрофлоксацин 10 мг/кг внутримышечно 2 раза в сутки в течение 7 дней). Выведение из эксперимента осуществляли медикаментозно передозировкой анестетиков (золетил 100–60 мг/кг в комбинации с ксилазином – 15 мг/кг).

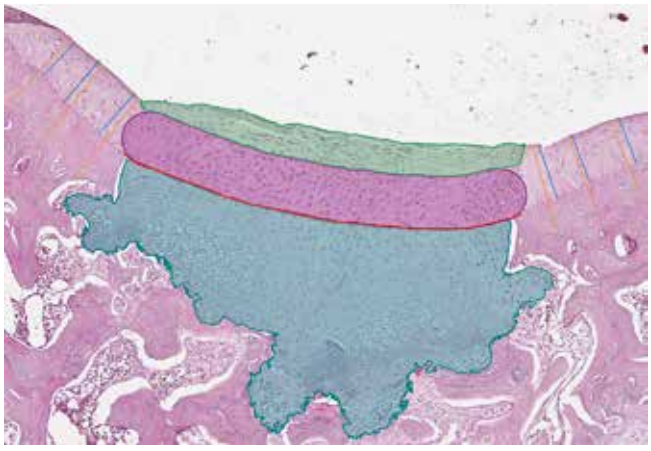


Рис. 1. Методика морфометрического анализа: красная линия – проекция фронта кальцификации (Tidemark), голубые линии – измерения толщины некальцинированной части интактного суставного хряща (поверхностная, средняя, глубокая зоны), оранжевые линии – измерения общей толщины интактного суставного хряща (поверхностная, средняя, глубокая зоны и зона кальцификации), бирюзовая область – регенерат губчатой и субхондральной кости, фронта кальцификации хряща, фиолетовая область – проекционная фигура поверхностной, средней и глубокой зон суставного хряща, отграничивающая хрящевой регенерат, зеленая область – зона гипертрофии ткани регенерата

Fig. 1. Morphometric analysis technique: red line, calcification front projection (Tidemark); blue lines, thickness measurements of the uncalcified part of intact articular cartilage (superficial, middle, and deep zones); orange lines, total thickness measurements of intact articular cartilage (superficial, middle, and deep zones and calcification zone); turquoise area, spongy and subchondral bone regeneration, the front of cartilage calcification; purple area, projection figure of the superficial, middle, and deep zones of the articular cartilage, delimiting cartilage regeneration; green area, hypertrophy zone of the regenerate tissue

Гистологический и морфометрический анализ. Полученные образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине, декальцинировали и заливали в парафин рутинными методами. Далее делали на микротоме парафиновые срезы толщиной 5 мкм с последующей депарафинацией и окрашиванием гематоксилином и эозином, сафранином О и зеленым прочным. Препараты оцифровывали на гистосканере Leica Aperio AT2 (Leica Biosystems, Германия).

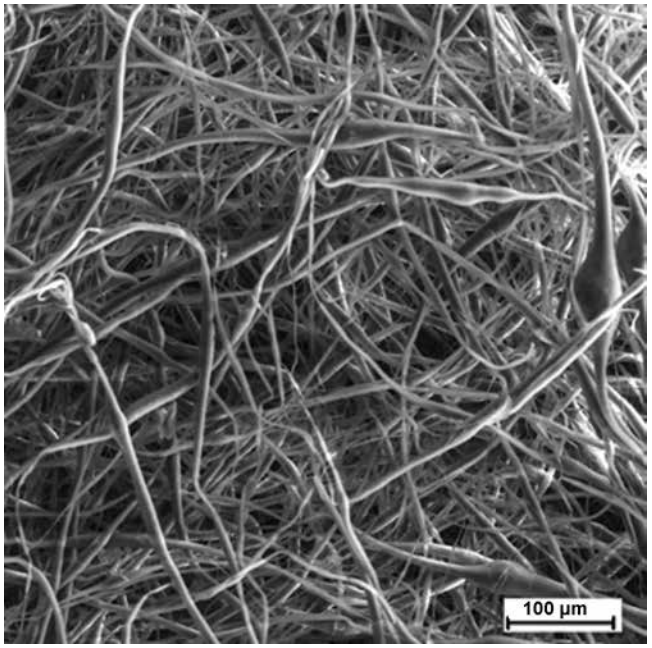
Гистоморфометрический анализ и гистологическая оценка. Исследование проводили на световом микроскопе Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия). Морфометрический анализ выполняли в программе QuPath (v.0.4.4., Великобритания). На микропрепаратах оценивали степень заполнения области дефекта губчатой и субхондральной кости, а также глубокой, средней, поверхностной зон хряща на основе схемы морфометрического анализа, предложенной Международным обществом восстановления хряща [13]. Использованный подход позволял определить площадь регенерата на основании среднего значения толщины поверхностной, средней и глубокой зон интактного хряща после проведения множественных измерений (не менее шести), давая возможность сделать выводы о степени заполнения дефекта (в процентах).

Гистологические препараты оценивали с использованием модифицированной шкалы O'Driscoll, дополнительно учитывавшей состояние субхондральной кости [14].

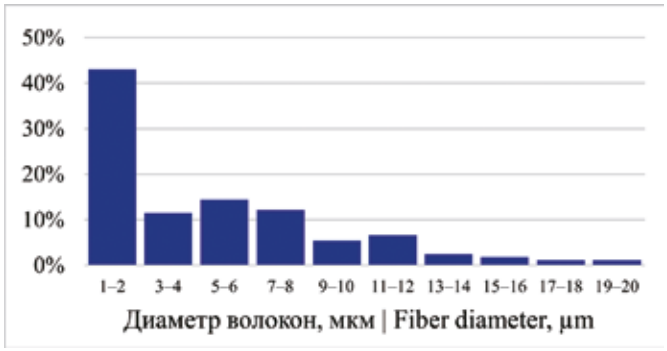
Статистический анализ. Данные фиксировали в программе Microsoft Excel 2019 (v.16.78.3, США), статистическую обработку проводили в IBM SPSS Statistics (v.27, США). Выполнялась проверка на соответствие нормальному распределению графическим и расчетным методами с применением теста Шапиро–Уилка. Оценка различий между независимыми совокупностями проводилась при помощи U-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни для парных сравнений, критерия Краскела–Уоллиса для оценки разницы в рамках одной группы на разных сроках выведения, критерия Данна с поправкой Бонферрони для апостериорных сравнений. Статистическая значимость принималась при $p<0,05$. Описание количественных и порядковых показателей, имеющих нормальное распределение, проводили при помощи средних значений (M) и стандартных отклонений (SD). При распределении, отличающемся от нормального, находили медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1; Q3).

Результаты

Морфология и физико-химические свойства нетканых материалов. Полимерные волокна со средним размером 5±3 мкм расположены хаотично (рис. 2 А, В). Исследование химической структуры поверхности нетканого материала методом ИК-спектроскопии показало, что спектр содержит только основные полосы поглощения поликапролактона, такие как 1722, 1240



B



C

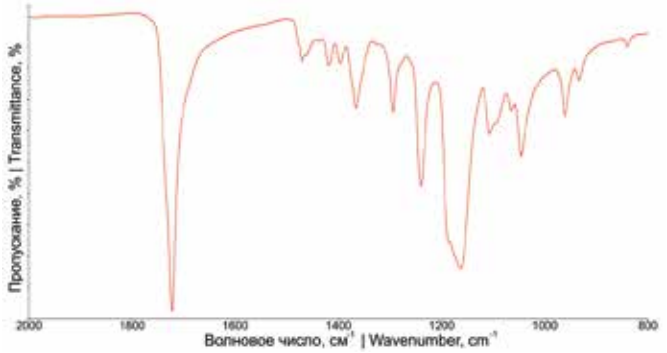


Рис. 2. Нетканый материал.
А – архитектоника имплантата (СЭМ).
В – распределение волокон имплантата по размеру.
С – ИК-спектр поверхности нетканого материала

Fig. 2. Nonwoven material.
A − scaffold architecture (SEM). B − scaffold fiber size distribution. C − IR-spectrum of the nonwoven material surface

и 1168 $см^{-1}$, которые соответствуют валентным колебаниям C=O и C–O–C в полиэфирах (рис. 2 С), что подтверждает отсутствие значительного количества природных компонентов (хитозан, желатин) на поверхности волокон.

Нетканый материал имплантата обладал гидрофобной поверхностью (Θ =105°) с тенденцией к уменьшению угла смачивания во времени. Деформационно-прочностные испытания показали, что предел прочности нетканого материала составлял 0,4±0,1 МПа, модуль Юнга − 4±0,3 МПа, удлинение при разрыве − 42±7%.

Гистологический анализ. На 7-й день у животных контрольной группы (1-я группа) четко визуализировалась полость дефекта с ровными краями в пределах суставного хряща, с перфорацией пластинки субхондральной кости (рис. 3 А). Губчатая кость имела сохранное трабекулярное строение. Суставной хрящ по краям дефекта без достоверных признаков дегенеративных процессов.

На 60-й день эксперимента дефект был частично заполнен пролифератом (рис. 3 В, С). Новообразованная ткань представлена неокончательно дифференцированной мезенхимой с тенденцией к формированию хряща смешанного типа. Так, в составе регенерата обнаруживались фиброциты, а также хондроциты. Тем не менее хондроциты имели вид гиперхромных и не формировали лакуны и изогенные группы. В области травматизации в большинстве случаев наблюдался остеолизис губчатой кости.

К 120-му дню исследования отмечалось полное или практически полное заполнение дефекта. Сформированная ткань представляла собой хрящ смешанного типа: комбинация грубоволокнистой и гиалиновой хрящевой ткани. Зональная организация, свойственная суставному хрящу, в ткани регенерата не прослеживалась. В ВКМ хаотично располагались фиброциты, а также хондроциты без лакун, не формирующие изогенных групп (рис. 3 D–F). При окрашивании сафранином О и зеленым прочным не отмечалось метахроматического сдвига, что свидетельствовало о низком содержании протеогликанов. Суставной хрящ по краям дефекта не имел выраженных признаков нарушения гистоархитектоники.

Во 2-й группе для замещения дефектов применяли имплантаты. На 7-й день от начала эксперимента в полости дефекта определялся фиксированный материал (рис. 4 А). Губчатая кость имела правильную структуру, края дефекта ровные, суставной гиалиновый хрящ по краям без признаков дегенеративных изменений.

К 60-му дню исследования отмечалось некоторое увеличение глубины дефекта за счет явления остеолизиса (рис. 4 В, С). В области дефекта обнаруживался имплантат, смещенный фронтом ткани регенерата к костному дефекту. По периферии имплантат

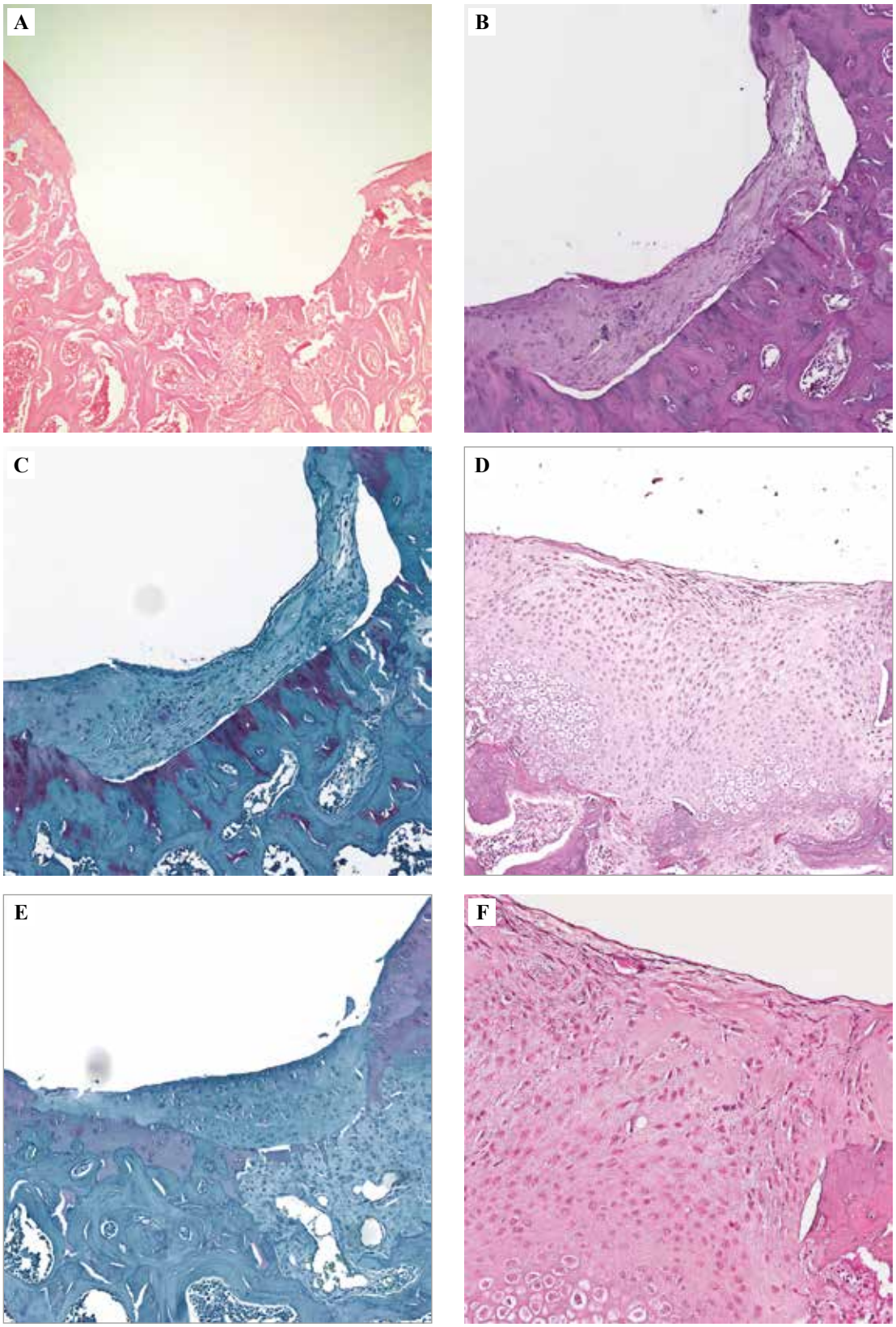


Рис. 3. 1-я группа (контроль).
A – 7-й день эксперимента, ×150. B, C – 60-й день эксперимента, ×200. D, E, F – 120-й день эксперимента. D, E – ×150, F – ×350. A, B, D, F – окраска гематоксилином и эозином. C, E – окраска сафранином О и зеленым прочным

Fig. 3. Group 1 (control).
A – day 7 of the experiment, ×150. B, C – day 60, ×200. D, E, F – day 120. D, E – ×150, F – ×350. A, B, D, F – H&E staining. C, E – Safranin O and Fast Green staining

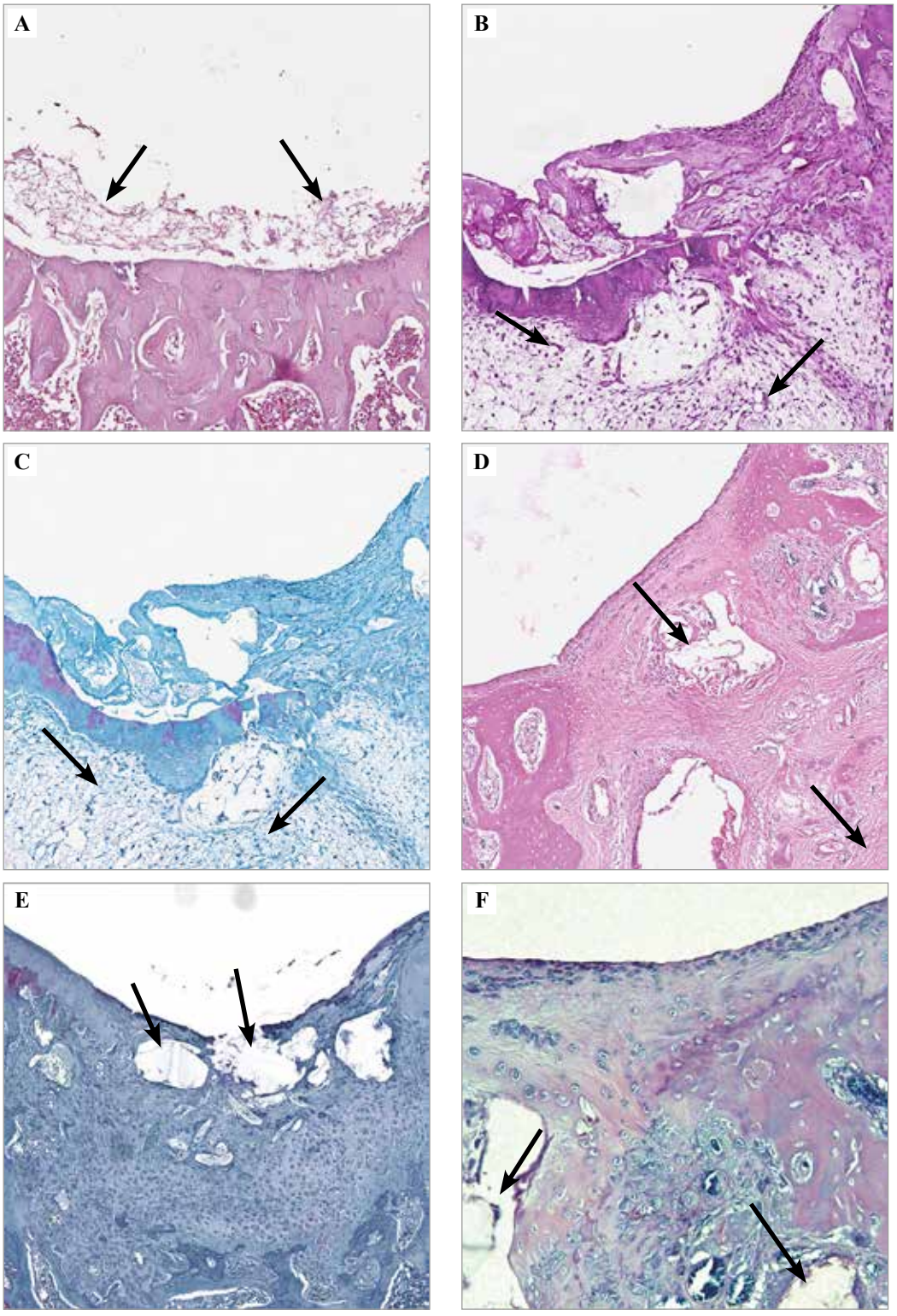


Рис. 4. 2-я группа (замещение дефекта имплантатом).
A – 7-е сутки эксперимента, фрагмент имплантата в области дефекта (*стрелки*), ×200. B, C – 60-е сутки эксперимента, имплантат в области костного дефекта (*стрелки*), ×200. D, E – 120-е сутки эксперимента, заполнение костного дефекта зрелой соединительной тканью, имплантат интегрирован в структуру ткани (*стрелки*). D, E – ×150, F – ×350.
A, B, D, F – окраска гематоксилином и эозином. C, E – окраска сафранином О и зеленым прочным

Fig. 4. Group 2 (replacement of the defect with a scaffold).
A – day 7 of the experiment, scaffold fragment in the area of the defect (*arrows*), ×200. B, C – day 60 of the experiment, scaffold in the area of the bone defect (*arrows*), ×200. D, E − day 120 of the experiment, filling the bone defect with mature connective tissue, the scaffold is integrated into the tissue structure (*arrows*). D, E − ×150, F − ×350. A, B, D, F − H&E staining.
C, E − Safranin O and Fast Green staining

был интегрирован с окружающей его фиброзной тканью, а в самой структуре имплантата присутствовали клетки без значимого развития ВКМ. У хрящевого дефекта отмечалось наличие хондроидного пролиферата, в составе которого обнаруживались хаотично расположенные и пикнотически измененные хондроциты. Окрашивание сафранином О и зеленым прочным не давало метахроматического сдвига.К 120-му дню эксперимента в большинстве полученных образцов (четыре из пяти) наблюдалось закрытие дефекта (рис. 4 D–F). В области, соответствовавшей проекции субхондральной кости, не было полного восстановления ее нативной структуры. Замещение в зоне костного дефекта происходило соединительной тканью смешанного типа, в составе которой обнаруживались фиброциты и хондроциты, отмечалось наличие кистозных расширений ткани. В области костного дефекта визуализировалась структура, соответствовавшая недеградированному имплантату, интегрированному в структуру ВКМ, обнаруживались клетки фиброцитарного и хондроцитарного типа. Суставная поверхность ткани регенерата была представлена молодой несозревшей хрящевой тканью. Хондроциты, находившиеся в поверхностной зоне регенерата, имели вытянутую форму и располагались цепочкой. В более глубоких зонах регенерата хондроциты имели округлую форму и гиперхромные ядра. Хаотично расположенные клетки формировали лакуны без изогенных групп. Перицеллюлярный матрикс окрашивался базофильно, а интертерриториальный ВКМ обладал выраженной оксифильностью и визуально не соответствовал зональной организации гиалиновой хрящевой суставной ткани. При окрашивании сафранином О и зеленым прочным метахроматический сдвиг не отмечался. Суставной хрящ в краях дефекта не имел выраженных морфологических признаков деструкции.

Гистоморфометрический анализ и гистологическая оценка. При внутригрупповых сравнениях результатов балльной оценки гистологических препаратов с использованием модифицированной шкалы O'Driscoll в зависимости от срока выведения животных из эксперимента (рис. 5 A) выявлена статистически значимая разница показателей в обеих группах исследования (p1=0,005; p2=0,002, соответственно). Апостериорные сравнения в обеих группах продемонстрировали повышение показателей балльной оценки на окончательных сроках наблюдения в сравнении с начальными сроками (p1(7 дн.–120 дн.)=0,005; p2(7 дн.–120 дн.)=0,002). Медиана показателя балльной оценки гистологических препаратов с использованием модифицированной шкалы O'Driscoll к 120-м суткам эксперимента в 1-й группе составила 18 баллов [17; 25], а во 2-й группе − 19 баллов [18; 20]. При попарных сравнениях результатов 1-й и 2-й групп на идентичных сроках выведения из эксперимента статистически значимые различия не выявлены.

Множественные внутригрупповые сравнения данных о проценте заполнения проекции поверхностной, средней и глубокой зон суставного хряща тканью регенерата в зависимости от времени после воздействия (рис. 5 B) продемонстрировали статистически значимую разницу показателей как в 1-й группе (p1=0,04), так и во 2-й (p2=0,016). Медиана показателя к 120-м суткам в 1-й группе составила 62,9 [41,8; 84,5], что было статистически значимо выше в сравнении с 7-ми и 60-ми сутками эксперимента (p1(7 дн.–60 дн.)=0,006 и p2(60 дн.–120 дн.)=0,025, соответственно), а во 2-й группе − 77,3 [76,7; 83,7], что было статистически значимо выше в сравнении со значениями на 7-е сутки эксперимента (p2(7 дн.–120 дн.)=0,016). При парном сравнении значений показателей между группами на идентичных сроках наблюдения статистически значимые различия не выявлены.

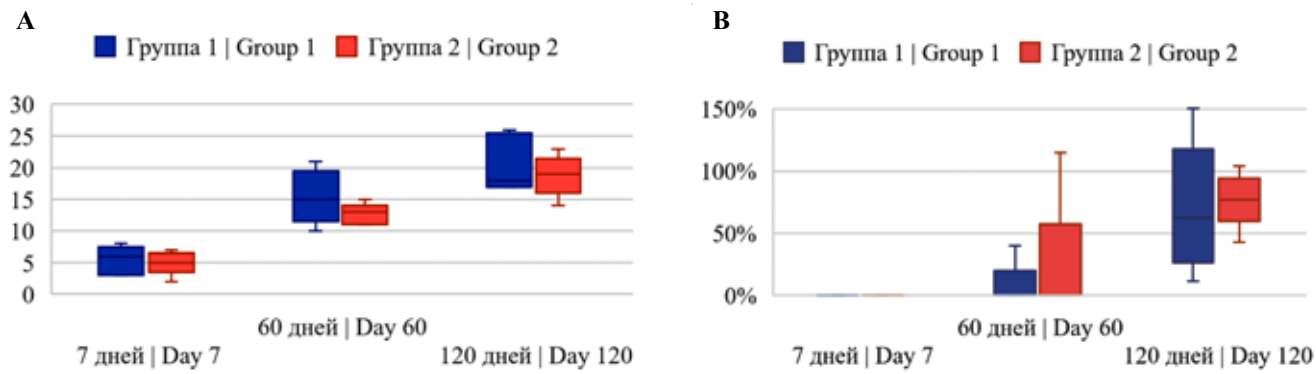


Рис. 5. Гистологическая и гистоморфометрическая оценка.
A − балльная оценка гистологических препаратов с использованием модифицированной шкалы O'Driscoll.
B − степень заполнения проекции суставного хряща
Fig. 5. Histological and histomorphometric assessment.
A − evaluation of histological samples using a modified O'Driscoll scale. B − degree of filling of the articular cartilage projection

Обсуждение

Одной из основных задач тканевой инженерии является создание материалов, которые по своим физическим, химическим и биологическим свойствам будут близки к нативным тканям [15, 16]. Разработка таких материалов требует оптимизации их состава и методик формования. Биодеградируемые полимеры синтетического происхождения (полилактид, ПКЛ и т.д.) могут быть задействованы при создании имплантатов, позволяют использовать широкий набор технологий производства. Введение природных компонентов в синтетические материалы приводит к повышению клеточной адгезии и скорости биодеградации имплантата [17, 18]. Тем не менее выбор полимеров для формования имплантата определяется не только его конечными свойствами, но и способностью полимера к переработке с использованием выбранной технологии. Электроформование позволяет получать микроволокнистые материалы для восстановления различных органов [19]. При этом создание многокомпонентных нетканых материалов, содержащих синтетические и природные компоненты, сопряжено с рядом трудностей (подбор совместных растворителей, послойное/многофильерное электроформование и т.д.). Исследование морфологии полученных нами нетканых материалов методом СЭМ показало наличие двух типов волокон: тонкие цилиндрической формы с диаметром волокна 2–4 мкм, что, вероятнее всего, относится к ПКЛ, и волокна с диаметром 10–20 мкм, что, возможно, связано с образованием агрегатов в мультикомпонентной системе [11]. ИК-МНПВО-спектроскопия показала, что поверхностный слой материала обогащен ПКЛ. Контактный угол смачивания в начальный момент времени также характерен для нетканых материалов из ПКЛ, а его снижение во времени может быть обусловлено наличием небольшого количества природных компонентов [11]. Деформационно-прочностные свойства нетканого материала во влажном состоянии были достаточны для имплантации [20].

В своем исследовании мы показали при помощи рутинных методов гистологического исследования и морфометрического анализа, что созданные имплантаты обладают способностью к поддержанию процесса регенерации в зоне локального дефекта суставного хряща. Следует отметить достоверное увеличение показателя процента заполнения области дефекта тканью регенерата к завершающим срокам эксперимента. При этом в составе пролиферата обнаруживались хондроциты, формировалась хрящеподобная ткань, однако ее организация к финальным срокам эксперимента не относилась к типу гиалиновой суставной хрящевой ткани. Наряду с этим следует отметить, что к финальным срокам эксперимента имплантат не подвергался полной биодеградации и обнаруживался в области костного дефекта. Сходные процессы регенерации хряща при испытании бесклеточных имплантатов на основе ПКЛ описаны S. Martinez-Diaz et al. [21]. Так, авторами высказано предположение, что отсутствие полной деградации соотносится с ключевой задачей имплантата, заключающейся в обеспечении пролиферирующей ткани защитой от чрезмерных сжимающих нагрузок, снижении агрессивных физических воздействий до уровня физиологических.

По мнению С.А. Ибрагимовой и соавт. [22], применение бесклеточных имплантатов способствует макроскопическому восстановлению дефекта. В то же время процесс полной регенерации с восстановлением организации ткани, подобной нативной структуре гиалинового хряща, может не наблюдаться. Дальнейшим направлением развития исследования полученных нами экспериментальных имплантатов видится их применение по технологии матрикс-индуцированной аутологичной имплантации хондроцитов, предполагающей создание тканеинженерного конструкта, обогащенного хондроцитами, с долгосрочными испытаниями на крупных лабораторных животных.

Ограничениями нашего исследования являлись сравнительно короткие сроки наблюдения, в результате которых не достигнуто полной биодеградации имплантатов, а также использование в качестве экспериментальных моделей мелких лабораторных животных.

Заключение

Показано, что имплантаты для замещения локальных дефектов суставного хряща, созданные на основе нетканого материала методом электроформования с использованием поликапролактона и многокомпонентной сополимерсодержащей системы на основе полилактида/поликапролактона/хитозана/олиголактида/желатина, способны поддерживать регенерацию в области дефекта хряща, однако нуждаются в дальнейшем изучении и совершенствовании. Применение имплантатов в эксперименте показало восстановление суставного хряща с формированием фиброзной хрящевой ткани.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – А.В. Лычагин, П.С. Тимашев, С.Г. Раденска-Лоповок, Т.С. Демина.
Сбор и обработка материала – Н.О. Белов, А.Л. Потапов, А.С. Курьянова, Д.А. Погосян, Ю.М. Ефремов.
Написание текста – Н.О. Белов, А.Л. Потапов, А.С. Курьянова.
Редактирование – С.Г. Раденска-Лоповок, Т.С. Демина, Е.Б. Калинский, Н.О. Белов.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – A.V. Lychagin, P.S. Timashev, S.G. Radenska-Lopovok, T.S. Demina.
Collected the data and performed the analysis – N.O. Belov, A.L. Potapov, A.S. Kuryanova, D.A. Pogosyan, Yu.M. Efremov.
Wrote the paper – N.O. Belov, A.L. Potapov, A.S. Kuryanova.
Edited the manuscript – S.G. Radenska-Lopovok, T.S. Demina, E.B. Kalinsky, N.O. Belov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Повреждение хряща коленного сустава: клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2024. Доступно по адресу: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/863_1 (получено 02.06.2026).
   Injury of the knee cartilage: clinical guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation. 2024 (In Russ.). Avaliable from: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/863_1 (accessed 02.06.2026).
2. *Лазишвили Т.Д., Гордиенко Д.И., Страхов М.А., Дошлова Д.В., Шпак М.А., Данилов М.А. и др.* Хирургическая коррекция локальных дефектов гиалинового хряща коленного сустава. Прошлое и настоящее. Хирургическая практика. 2016;(1):46–52. Доступно по адресу: https://elibrary.ru/item.asp?id=28190240 (получено 02.06.2026).
   Lazishvili TD, Gordienko DI, Strachov MA, Doshllova DV, Shpak MA, Danilov MA et al. Surgical correction of local defects of hyaline cartilage of the knee joint. Past and present. Surgical Practice. 2016;(1):46–52 (In Russ.). Available from: https://elibrary.ru/item.asp?id=28190240 (accessed 02.06.2026).
3. *Захватов А.Н., Беляев А.Н., Кузнецов С.И., Аткина Н.А.* Коррекция нарушений метаболизма суставного хряща и морфологическая оценка эффективности внутрисуставной озонотерапии при экспериментальном посттравматическом артрите. Вестник Мордовского университета. 2016;26(3):359–369. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.359–369.
   Zakhvatov AN, Belyayev AN, Kuznetsov SI, Atkina NA. Correction of metabolic disorders of the articular cartilage and morphological evaluation of intra-ozone therapy in experimental post-traumatic arthritis. Mordovia University Bulletin. 2016;26(3):359–369 (In Russ.). DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.359-369.
4. WN Scott, DR Diduch, R Iorio, WJ Long (eds.). Insall & Scott surgery of the knee. 6th ed. Philadelphia (PA): Elsevier, 2018. 2144 p.
5. *Migliorini F, Maffulli N, Bell A, Hildebrand F, Weber CD, Lichte P.* Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC) for osteochondral defects of the talus: a systematic review. Life (Basel). 2022;12(11):1738. DOI: 10.3390/life12111738.
6. *Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y.* Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. RSC Adv. 2019;9(45):26252–62. DOI: 10.1039/c9ra05214c.
7. *Volz M, Schaumburger J, Gelliβen J, Grifka J, Anders S.* A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC) over microfracture: 10-year follow-up. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2024;34(5):2429–37. DOI: 10.1007/s00590-024-03948-0.
8. *Bistolfi A, Ferracini R, Galletta C, Tosto F, Sgarminato V, Digo E et al.* Regeneration of articular cartilage: scaffold used in orthopedic surgery. A short handbook of available products for regenerative joints surgery. Clin Sci Res Rep. 2017;1(1):1–7. DOI: 10.15761/CSRR.1000101.
9. *Sánchez Alepuz E, Part Soriano J, Peregrin Nevado I, Zurriaga Carda J, Gómez Alessandri JM, Vicente Díaz J et al.* Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC). Rev Esp Artrosc Cir Articul (Engl Ed). 2021;28(1):27–35. DOI: 10.24129/j.reacae.28171.fs1907031.
10. *Wasyłeczko M, Sikorska W, Chwojnowski A.* Review of synthetic and hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering. Membranes (Basel). 2020;10(11):348. DOI: 10.3390/membranes10110348.
11. *Demina TS, Kuryanova AS, Bikmulina PY, Aksenova NA, Efremov YM, Khaibullin ZI et al.* Multicomponent non-woven fibrous mats with balanced processing and functional properties. Polymers (Basel). 2020;12(9):1911. DOI: 10.3390/polym12091911.
12. ASTM F2451-05(2010). Standard guide for *in vivo* assessment of implantable devices intended to repair or regenerate articular cartilage. West Conshohocken (PA): ASTM International, 2010. 12 p.
13. *Hoemann C, Kandel R, Roberts S, Saris DB, Creemers L, Mainil-Varlet P et al.* International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. Cartilage. 2011;2(2):153–72. DOI: 10.1177/1947603510397535.
14. *Veronesi F, Cadossi M, Giavaresi G, Martini L, Setti S, Buda R et al.* Pulsed electromagnetic fields combined with a collagenous scaffold and bone marrow concentrate enhance osteochondral regeneration: an *in vivo* study. BMC Musculoskelet Disord. 2015;16:233. DOI: 10.1186/s12891-015-0683-2.
15. *Liu W, Thomopoulos S, Xia Y.* Electrospun nanofibers for regenerative medicine. Adv Healthc Mater. 2011;1(1):10–25. DOI: 10.1002/adhm.201100021.
16. *Dzobo K, Thomford NE, Senthebane DA, Shipanga H, Rowe A, Dandara C et al.* Advances in regenerative medicine and tissue engineering: innovation and transformation of medicine. Stem Cells Int. 2018;2018:2495848. DOI: 10.1155/2018/2495848.
17. *Sharif S, Ai J, Azami M, Verdi J, Atlasi MA*, *Shirian S et al.* Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(4):1578–86. DOI: 10.1002/jbm.b.33966.
18. *Sell SA, McClure MJ, Garg K, Wolfe PS, Bowlin GL.* Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(12):1007–19. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.012.
19. *Mochane MJ, Motsoeneng TS, Sadiku ER, Mokhena TC, Sefadi JS.* Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: a mini review. Appl Sci. 2019;9(11):2205. DOI: 10.3390/app9112205.
20. *Ippel BD, Van Haaften EE, Bouten CVC, Dankers PYW.* Impact of additives on mechanical properties of supramolecular electrospun scaffolds. ACS Appl Polym Mater. 2020;2(9):3742–8. DOI: 10.1021/acsapm.0c00658.
21. *Martinez-Diaz S, Garcia-Giralt N, Lebourg M, Gómez-Tejedor JA, Vila G, Caceres E et al. In vivo* evaluation of 3-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits. Am J Sports Med. 2010;38(3):509–19. DOI: 10.1177/0363546509352448.
22. *Ibragimova SI, Medvedeva EV, Romanova IA, Istranov LP, Istranova EV, Lychagin AV et al.* Implantation of various cell-free matrixes does not contribute to the restoration of hyaline cartilage within full-thickness focal defects. Int J Mol Sci. 2022;23(1):292. DOI: 10.3390/ijms23010292.

Информация об авторах

Никита Олегович Белов − аспирант кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф; ассистент кафедры безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Арсений Леонидович Потапов – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории оптической когерентной томографии Приволжского исследовательского медицинского университета.

Анастасия Сергеевна Курьянова – кандидат химических наук, младший научный сотрудник Института регенеративной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), научный сотрудник лаборатории модифицированных полимерных систем Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семенова.

Стефка Господиновна Раденска-Лоповок − доктор медицинских наук, профессор, профессор Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), профессор кафедры патологической анатомии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России.

Татьяна Сергеевна Демина – доктор химических наук, профессор Института регенеративной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), старший научный сотрудник лаборатории твердофазных химических реакций Института синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова.

Давид Артурович Погосян – аспирант кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф, ассистент кафедры безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Юрий Михайлович Ефремов – кандидат биологических наук, заведующий отделом современных биоматериалов, доцент Института регенеративной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Евгений Борисович Калинский – доктор медицинских наук, профессор кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Петр Сергеевич Тимашев – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии, директор Института регенеративной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Алексей Владимирович Лычагин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Author information

Nikita O. Belov − Postgraduate Student, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery; Assistant, Department of Life Safety and Disaster Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0001-5556-2826

Arseniy L. Potapov − Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher, Laboratory of Optical Coherence Tomography, Privolzhsky Research Medical University.
https://orcid.org/0000-0003-4343-2500

Anastasia S. Kuryanova − Cand. Sci. (Chem.), Junior Researcher, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Researcher, Laboratory of Modified Polymer Systems, N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics.
https://orcid.org/0000-0002-9791-1745

Stefka G. Radenska-Lopovok – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Professor, Department of Anatomic Pathology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.
https://orcid.org/0000-0002-4669-260X

Tatiana S. Demina − Dr. Sci. (Chem.), Professor, Institute of Regenerative Medicine I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Senior Researcher, Laboratory of Solid-Phase Chemical Reactions, Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials.
https://orcid.org/0000-0003-0271-2231

David A. Pogosyan − Postgraduate Student, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery, Assistant, Department of Life Safety and Disaster Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0003-0620-0014

Yuri M. Efremov − Cand. Sci. (Biol.), Head of the Department of Modern Biomaterials, Associate Professor, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0001-7040-253X

Eugene B. Kalinsky − Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0002-8103-5613

Peter S. Timashev − Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Director of the Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0001-7773-2435

Alexey V. Lychagin − Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
https://orcid.org/0000-0002-2202-8149

© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.67-76 УДК: 616.12-007.61

Перипартальная кардиомиопатия с некомпактным миокардом правого желудочка: описание наблюдения и обзор литературы

И.В. Баринова[1,3], М.Ю. Шахина[1], Л.В. Кактурский[2], К.В. Агапова[4], И.А. Сергеева[5], А.В. Пырегов[1,6], Р.Г. Шмаков[1,7]

[1] ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии имени академика В.И. Краснопольского Минздрава Московской области, Москва, Россия
[2] ГНЦ РФ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия
[3] ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия
[4] ГБУЗ Московской области Люберецкая областная клиническая больница Минздрава Московской области, Люберцы, Россия
[5] ГБУЗ Московской области Щелковский перинатальный центр Минздрава Московской области, Щелково, Россия
[6] ФГБУ Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
[7] ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), Москва, Россия

Резюме. Описано редкое наблюдение летальной перипартальной кардиомиопатии у родильницы с сочетанными признаками дилатационной, гипертрофической и губчатой кардиомиопатии. Представлен комплекс макро- и микроскопических особенностей, на основании которых сформулирован окончательный патологоанатомический диагноз. Приводятся данные научной литературы, касающиеся этиологии и патогенеза этого поражения миокарда, клинических и морфологических диагностических критериев, возможностей лечения. Обсуждаются сложности клинической и морфологической диагностики кардиомиопатии у беременных и в послеродовом периоде.

Ключевые слова: перипартальная кардиомиопатия, некомпактный миокард, послеродовый период, гипертрофия кардиомиоцитов

Для корреспонденции: Ирина Владимировна Баринова. E-mail: barinova.irina.vladimirovna@gmail.com

Для цитирования: Баринова И.В., Шахина М.Ю., Кактурский Л.В., Агапова К.В., Сергеева И.А., Пырегов А.В., Шмаков Р.Г. Перипартальная кардиомиопатия с некомпактным миокардом правого желудочка: описание наблюдения и обзор литературы. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):67–76. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.67-76.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 10.06.2026. **Получена после рецензирования** 15.06.2026. **Принята в печать** 22.06.2026.

Peripartum cardiomyopathy with right ventricular non-compact myocardium: a case report and literature review

I.V. Barinova[1,3], M.Yu. Shakhina[1], L.V. Kakturskiy[2], K.V. Agapova[4], I.A. Sergeeva[5], A.V. Pyregov[1,6], R.G. Shmakov[1,7]

[1] Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia
[2] Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia
[3] Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia
[4] Lyubertsy Regional Clinical Hospital, Lyubertsy, Russia
[5] Shchelkovo Perinatal Center, Shchelkovo, Russia
[6] Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia
[7] Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russia

Abstract. This paper describes a rare case of fatal peripartum cardiomyopathy in a puerperant woman with combined features of dilated, hypertrophic, and spongiform cardiomyopathy. Literature review summarizes etiology, pathogenesis, clinical and morphological diagnostic criteria, and treatment options. The article also

discusses challenges of clinical and morphological diagnosis of cardiomyopathy during pregnancy and the postpartum period.

Keywords: peripartum cardiomyopathy, non-compaction cardiomyopathy, postpartum period, cardiomyocyte hypertrophy

Corresponding author: Irina V. Barinova. E-mail: barinova.irina.vladimirovna@gmail.com

For citation: Barinova I.V., Shakhina M.Yu., Kakturskiy L.V., Agapova K.V., Sergeeva I.A., Pyregov A.V., Shmakov R.G. Peripartum cardiomyopathy with right ventricular non-compact myocardium: a case report and literature review. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):67–76 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.67-76.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

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

Received 10.06.2026. **Received in revised form** 15.06.2026. **Accepted** 22.06.2026.

Введение

Эпидемиология. Перипартальная кардиомиопатия (ППКМП, родовая кардиомиопатия, перипартальная болезнь, кардиомиопатия Мидоуса) – это разновидность дилатационной кардиомиопатии, совпадающая по времени с беременностью, развивающаяся чаще всего в течение 5–6 месяцев после родоразрешения, значительно реже – в последние недели беременности. Данное заболевание впервые было описано французским врачом Ц. Рицше в 1849 году и получило международное название Peripartum cardiomyopathy, околородовая/перипартальная кардиомиопатия [1, 2]. «Перипартальная кардиомиопатия» – диагноз исключения, при котором у пациенток в анамнезе нет патологий сердца, а другие возможные причины сердечной недостаточности неизвестны, то есть это заболевание с необъяснимой левожелудочковой систолической дисфункцией, развивающейся до родов или после них. В 1997 году было сделано дополнение, что левожелудочковая дисфункция должна быть подтверждена эхокардиографически. Средняя распространенность составляет 1 случай на 10 000 родов. ППКМП чаще возникает у представительниц негроидной расы, поэтому в африканских странах ее встречаемость намного выше (1:100). Этиология этого быстро развивающегося заболевания миокарда неизвестна. Рассматривают возможное воздействие инфекционно-токсических, аутоиммунных, метаболических, генетических факторов [1, 3, 4]. Результаты, полученные в части случаев при биопсии эндомиокарда и на аутопсии (лейкоцитарная инфильтрация и гипертрофия мышечной ткани сердца, интерстициальный отек, очаги некробиоза и фиброза), заставляют предполагать инфекционную, в том числе вирусную этиологию в качестве триггера аутоиммунного миокардита как причины заболевания [1]. К факторам риска развития кардиомиопатии, индуцированной беременностью, относят старший возраст (30 лет и больше), повторные роды (много рожавшие женщины), многоплодную беременность, осложненное течение предыдущих беременностей (преэклампсия, артериальная гипертензия), неблагоприятные социально-экономические условия, дефицит селена, длительную (более 4 недель) токолитическую терапию β-адреномиметическими средствами [1].

Патогенез. Подчеркивается роль оксидативного стресса, одним из пусковых механизмов которого является 16 кDa фрагмент пролактина, обладающий антиангиогенным, провоспалительным действием, вызывающий апоптоз кардиомиоцитов. Экспериментально показано токсическое влияние пролактина на кардиомиоциты с метаболическими изменениями, повреждениями межклеточного матрикса и дисфункцией сердечной мышцы. Установлено, что антиангиогенный фактор sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1, растворимая FMS-подобная тирозинкиназа-1), так называемый растворимый рецептор эндотелиального сосудистого фактора роста, вызывает нарушение сократимости миокарда и развитие ППКМП у мышей [5, 6]. Кроме того, у пациенток с ППКМП в раннем послеродовом периоде обнаружено повышение уровня проангиогенного плацентарного фактора роста (placental growth factor, PLGF) и показана эффективность введения анти-PLGF-фактора как способа профилактики нарушения сократительной деятельности миокарда [6]. Развитие сердечной недостаточности идет главным образом двумя путями: первый путь – пролактин 16 кDa ингибирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, вызывает их апоптоз и разрывает ранее сформировавшиеся капиллярные структуры, усиливает вазоконстрикцию и ухудшает функцию кардиомиоцитов, второй путь – нарушение баланса между плацентарными антиангиогенным фактором sFlt-1 и проангиогенным фактором PLGF [4].

Подтверждается значение генетических нарушений в развитии ППКМП: установлено, что около 15% пациенток имеют такие же мутации в генах, как при дилатационной кардиомиопатии, причем бессимптомные до беременности у большинства носительниц. Описано несколько мутаций генов, таких как тяжелая цепь сердечного миозина, титин и *SCN5* [7, 8]. Гемодинамические изменения на поздних сроках беременности, в родах и послеродовом периоде (увеличение частоты сердечных сокращений, сердечного выброса, снижение общего периферического сосудистого сопро-

тивления, перегрузка сердца объемом) могут быть пусковым механизмом активации генетических поломок. Кроме того, более высокая заболеваемость в конкретных этнических группах и определенных районах мира подтверждает роль генетических факторов [4].

Некомпактный миокард является крайне редким видом поражения сердечной мышцы, который относят к врожденной, первичной кардиомиопатии левого желудочка, описанной в 1984 году немецкими кардиологами R. Engberding (Рольф Энгбердинг) и F. Bender (Франц Бендер), характеризующейся аутосомно-доминантным типом наследования в 44%, встречающейся как самостоятельная форма, так и при других заболеваниях сердца. В качестве механизма рассматривают нарушение формирования нормального миокарда из эмбрионального губчатого, который в отсутствие коронарного кровотока кровоснабжается из полостей сердца. Хотя процесс чаще всего затрагивает верхушку и нижнюю стенку левого желудочка, он может определяться в любой стенке левого и правого желудочков. Последний может быть некомпактным, однако он более трабекулярен в норме, в связи с чем диагностика некомпактного миокарда правого желудочка затруднена [2, 9–11].

Клиническая диагностика. ППКМП является значимой причиной материнской заболеваемости и смертности во всем мире [12]. Чаще всего симптомы ППКМП указывают на сердечную недостаточность (например, ортопноэ и пароксизмальная ночная одышка и др.) и возникают в течение первой недели после родоразрешения. Эти симптомы обычно связывают с нормальной беременностью или осложнениями, такими как преэклампсия/эклампсия, поэтому диагноз послеродовой кардиомиопатии легко пропустить. При физикальном обследовании выявляются тахикардия, повышенное давление в яремных венах, двусторонние хрипы в легких, обусловленные их отеком, выслушивание третьего тона сердца (S3) и смещение верхушечного пульса. В тяжелых случаях может наблюдаться острая дыхательная недостаточность или кардиогенный шок [13, 14]. На электрокардиограмме могут возникать неспецифические изменения, такие как синусовая тахикардия, межжелудочковая задержка и иногда картина блокады левой ножки пучка Гиса. Эхокардиография позволяет дифференцировать ППКМП и, как правило, выявляет дилатацию левого желудочка различной степени, систолическую дисфункцию левого желудочка (фракция изгнания менее 45%, фракция укорочения менее 30% и/или конечно-диастолический размер более 2,7 см/м^2), расширение правого желудочка и обоих предсердий, митральную и трехстворчатую регургитацию, легочную гипертензию и внутрисердечный тромб [15]. Магнитно-резонансная томография сердца также может использоваться для диагностики, когда требуется точная оценка фракции выброса [16, 17]. Рентгенография грудной клетки часто выявляет отек легких, а также может выявить увеличение контуров сердца или плевральный выпот (либо и то, и другое). Уровень натрийуретического пептида B-типа (brain natriuretic peptide, BNP) и N-концевого proBNP обычно повышен при ППКМП [14].

Лечение поддерживающее и направлено на купирование симптомов сердечной недостаточности. При развитии отека легких или кардиогенного шока важно следовать ведущим рекомендациям по лечению острой сердечной недостаточности. Диуретическая терапия необходима пациенткам с застоем в легких и перегрузкой объемом. Терапию следует начинать с петлевых диуретиков [14, 18]. С целью блокады секреции пролактина для устранения его неблагоприятного влияния применяют бромокриптин. Препарат увеличивает ударный объем левого желудочка и уменьшает давление его наполнения. Присоединение к терапии бромокриптина улучшает фракцию левого желудочка и способствует клиническому восстановлению при ППКМП [19].

Морфологическая диагностика. Научной литературы с описанием морфологических изменений при ППКМП практически нет, за исключением работ с описанием гистологических изменений миокарда при дилатационной кардиомиопатии, причина которой может быть разной (токсические, инфекционные воздействия и другие состояния). Посмертная диагностика основывается на результатах вскрытия. Наряду с выраженными признаками декомпенсации сердечной деятельности (жидкость в полостях тела, отек подкожно-жировой клетчатки, «мускатная» печень, цианотическая индурация селезенки и др.) отмечается увеличение размеров сердца с дилатацией его полостей. При этом сердце увеличивается в поперечном размере, превышающем продольный размер, верхушка сглажена, закруглена, и орган приобретает шаровидную форму. Пристеночный эндокард утолщен, белесоват за счет фиброэластоза, который сопровождает сердечную декомпенсацию. Клапаны сердца и интима венечных артерий интактны. На разрезе в миокарде определяются мелкие очажки склероза. При вторичной ППКМП отмечается нерезко выраженная гипертрофия миокарда, под эпикардом – повышенное отложение жировой ткани, полость левого желудочка умеренно расширена. Миокард на ощупь дряблый, на разрезе может иметь несколько желтоватый оттенок.

Микроскопические изменения неспецифичные и должны учитываться лишь в тесной связи с клиническими и секционными данными. Обнаруживают острые очаговые повреждения миокарда контрактурного типа и по типу миоцитолизиса, иногда признаки клеточной реакции на эти повреждения, а также мелкоочаговые фиброзные изменения. Выражена гипертрофия кардиомиоцитов, но наряду с ней имеются и атрофированные мышечные волокна. Характерно внеклеточное разрастание жировой ткани в строме миокарда, вокруг интрамуральных сосудов. Иногда могут встречаться признаки, свойственные гипертрофической кардиомио-

патии, – хаотичное распределение мышечных волокон, перинуклеарное просветление саркоплазмы (эффект гало) в виде прозрачного ободка, обусловленное тем, что вокруг ядер происходит накопление атипичных гранул гликогена, которые вымываются при гистологической проводке препарата. Также может быть зазубренность контуров ядер кардиомиоцитов [20].

Клиническое наблюдение

Аналитическое описание наблюдения одобрено локальным этическим комитетом Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии имени академика В.И. Краснопольского (протокол б/н от 27.05.2026). Получено добровольное информированное согласие на публикацию этого наблюдения в открытой печати.

Пациентка 29 лет, беременность пятая, роды вторые, в анамнезе три самопроизвольных выкидыша на ранних сроках. Течение беременности: наблюдалась в женской консультации с 10–11 недель, стационарное лечение по поводу угрозы прерывания на сроке 5–6 недель и 29 недель, с 32 недель отмечались отеки нижних конечностей, госпитализирована на сроке 35 недель в связи с гестационной артериальной гипертензией и отеками. Экстренное кесарево сечение, извлечен живой недоношенный мальчик – вес 3140 г, рост 49 см, оценка по шкале Апгар 8/8 баллов. Во время операции отмечен выраженный отек подкожной клетчатки передней брюшной стенки, асцит 500 мл. В послеродовом периоде при эхографическом исследовании с пятых суток выявлена дилатация правых камер сердца, тахикардия 100 уд./мин, одиночные наджелудочковые экстрасистолии и признаки перегрузки правых отделов, при компьютерной томографии признаки легочной гипертензии и свободной жидкости в брюшной полости. Несмотря на интенсивную терапию, состояние родильницы прогрессивно ухудшалось: нарастали отеки мягких тканей в области спины и живота, одышка при незначительной физической нагрузке, чувство нехватки воздуха, хрипы с двух сторон, акроцианоз, гипоксемия, асцит, переведена на искусственную вентиляцию легких. Рентгенологически выявлены признаки легочной гипертензии с перегрузкой правых отделов сердца. По лабораторным данным респираторный алкалоз, метаболический ацидоз. Смерть последовала на восьмые сутки после преждевременных оперативных родов.

Заключительный клинический диагноз. Основное заболевание. Дилатационная кардиомиопатия. Вторые преждевременные оперативные роды в головном предлежании на сроке 35 недель 6 дней. Осложнения основного заболевания. Умеренная преэклампсия. Острая сердечная недостаточность. Отек легких. Отек головного мозга. Сопутствующие заболевания. Плацентарные нарушения, декомпенсация. Ангидрамнион. Хроническая артериальная гипертензия.

Посмертное патологоанатомическое исследование. На вскрытии родильницы (восьмые сутки после кесарева сечения на сроке 35 недель) выявлены признаки декомпенсации кровообращения – анасарка с отеком подкожно-жировой клетчатки нижней половины туловища и нижних конечностей, асцит 1500 мл, гидроторакс по 400 мл, гидроперикард 30 мл. Сердце 13×8×7 см, масса 360 г, с выраженными жировыми отложениями в эпикарде (рис. 1 A), толщина стенки правого желудочка 0,3 см, левого – 1,8 см. Полости желудочков и предсердий расширены, со свертками и небольшим количеством жидкой крови. Эндокард сероватого цвета, гладкий, клапаны тонкие, полупрозрачные. Миокард дряблый, на разрезе буро-красного цвета, неравномерного кровенаполнения, выражена гипертрофия мясистых трабекул правого и левого желудочков с глубокими щелевидными углублениями между ними (рис. 1 B). В просвете бронхов большое количество пенистого содержимого (рис. 1 C). Легкие массой 1480 г, красно-синюшного цвета, плотноэластической консистенции, с поверхности разреза стекает большое количество пенистого содержимого (рис. 1 D). В легочных артериях темная жидкая кровь. Печень 35×14×12×8 см, масса 2650 г, плотной консистенции, на разрезе с выраженным «мускатным» рисунком (рис. 1 E, F). Селезенка 14×7×5 см, масса 340 г, плотная, с гладкой капсулой, на разрезе вишневого цвета, без соскоба пульпы. Головной мозг массой 1450 г, вещество мозга дряблое, влажного вида, боковые желудочки не расширены, эпендима гладкая. Почки по 14×7×4 см, массой по 140 г, капсула снимается легко, вокруг лоханок избыточное разрастание жировой ткани, корковый слой красно-синюшного цвета, пирамидки мозгового слоя цианотичные. Матка 20×12×8 см, швы операционного разреза состоятельны, герметичны, в дне на слизистой оболочке фиксированные свертки крови на площади 5×5 см, эндометрий шероховатый, красного цвета. В просвете желудка небольшое количество геморрагического содержимого, слизистая серого цвета с геморрагическим прокрашиванием, складки выражены. В кишечнике геморрагическое содержимое во всех отделах.

Гистологическое исследование. Строение миокарда с подчеркнутой трабекулярностью, участками некомпактного миокарда, глубокими щелевидными пространствами между трабекул до субэпикардиальных отделов (рис. 2 A, B). Кардиомиоциты гипертрофированные, с гиперхромией и полиморфизмом ядер (рис. 2 C). Имеются обширные повреждения в виде контрактур (гиперэозинофилия) и фрагментации (рис. 2 D), миолиз с подчеркнутыми вставочными дисками, глыбчатым распадом, безъядерными участками (рис. 2 E), определяются очаги миомаляции (фиолетовые), нарушение архитектоники мышечных волокон, ориентированных в разных направлениях (рис. 2 F), отмечается волнообразная деформация кардиомиоцитов (рис. 2 G). При ШИК-реакции гликоген выявляется в виде гранул как в перинуклеарной зоне кардиомиоцитов, так и на других участках цито-

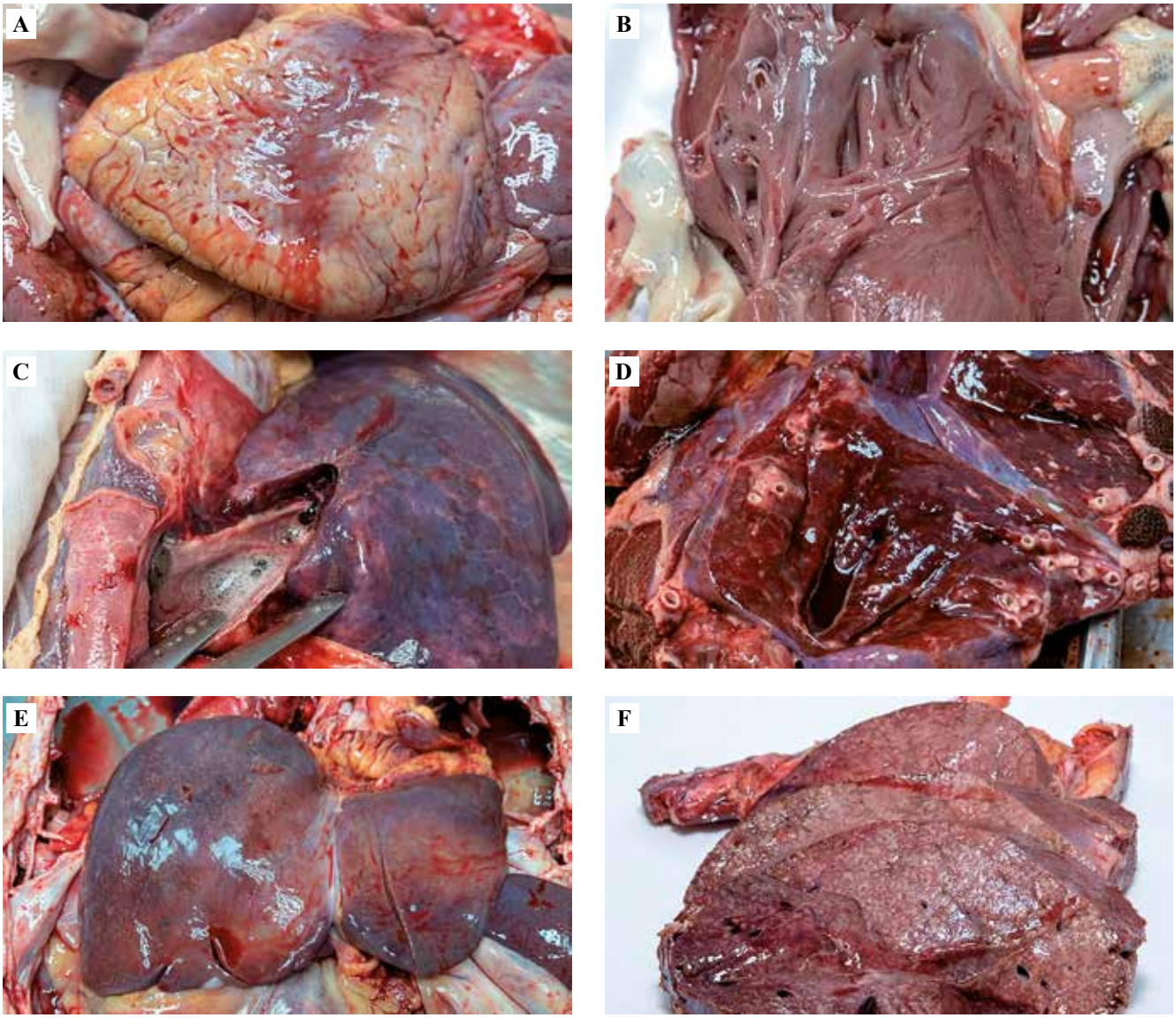


Рис. 1. Макроскопические изменения сердца, легких и печени родильницы.
A – обильная жировая ткань в эпикарде. B – гипертрофия мясистых трабекул. C – прозрачная пенистая жидкость в бронхах. D – отек и полнокровие легких. E – гепатомегалия и цианоз. F – «мускатная» печень на разрезе

Fig. 1. Gross changes in the heart, lungs, and liver of a woman in labor.
A – abundant adipose tissue in the epicardium. B – hypertrophy of the fleshy trabeculae. C – edematous fluid in the bronchi. D – pulmonary edema and congestion. E – hepatomegaly and cyanosis. F – nutmeg liver on cross-section

плазмы (рис. 2 H). Иммуногистохимическая реакция с антителами к эстрогену и прогестерону в кардиомиоцитах отрицательная. Стромальный компонент миокарда характеризуется определенными особенностями. Эндокард утолщен за счет отека и субэндокардиального склероза (рис. 3 A). Субэндокардиальные миоциты проводящих путей крупные, с бледно окрашенной цитоплазмой. Субэпикардиально – массивные участки жировой ткани. Строма миокарда с диффузным отеком и фиброзными изменениями, отмечаются выраженный периваскулярный фиброз и липоматоз (рис. 3 B–D), очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация, преимущественно периваскулярная, в отдельных капиллярах лейкостазы. Эндотелий сосудов и капилляров набухший, крупные субэпикардиальные сосуды склерозированы, определяются отдельные спазмированные сосуды с дислокацией эндотелиоцитов в виде частокола (рис. 3 E, F). В легких просвет альвеол расширен, заполнен отечной жидкостью, полнокровие межальвеолярных перегородок, слабо выраженный перибронхиальный и периваскулярный фиброз. Печень – резко выраженное полнокровие с расширением синусоидов и центральных вен, выраженная распространенная гидропическая дистрофия гепатоцитов. Селезенка – резкое полнокровие синусоидов красной пульпы, мелкие лим-

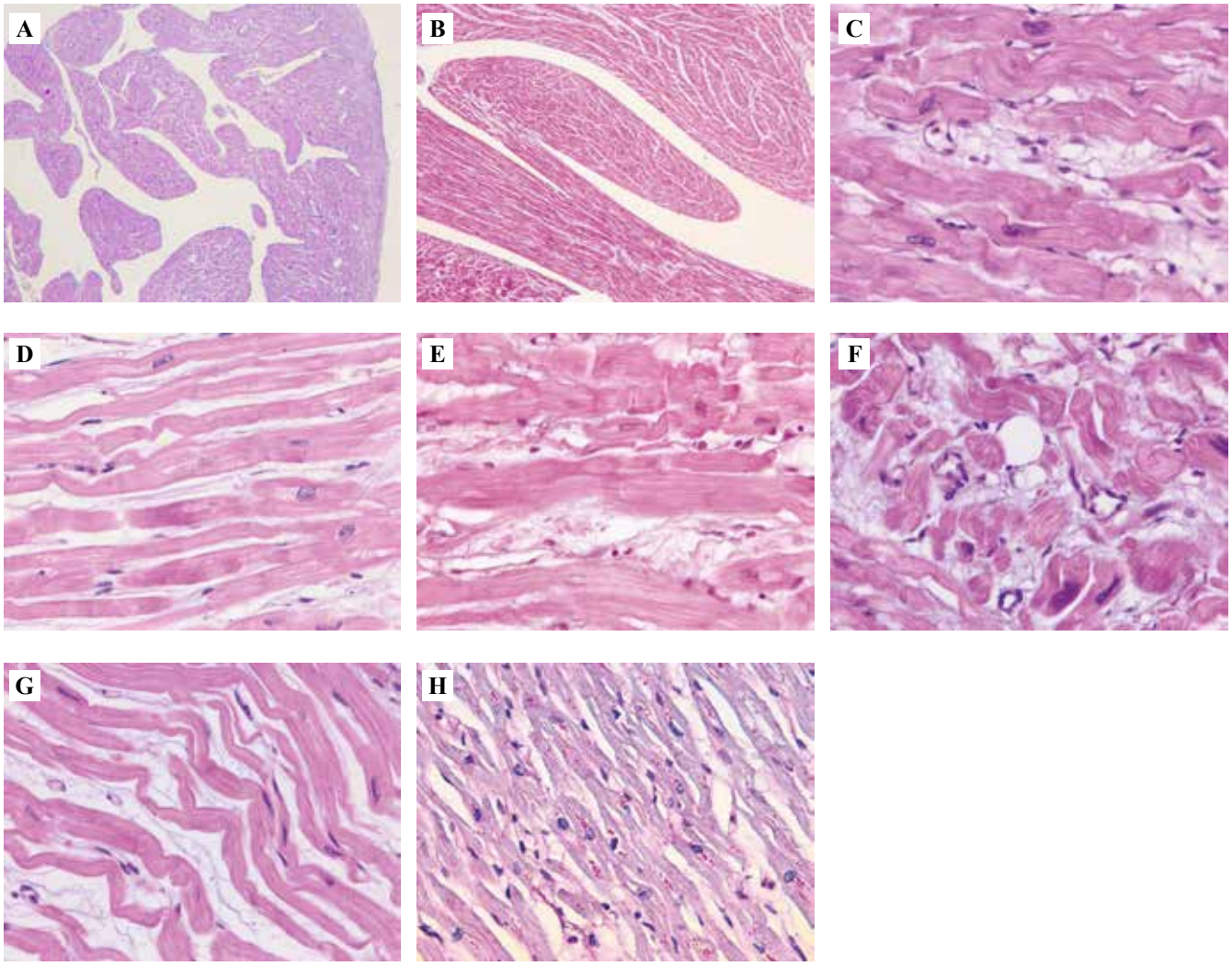


Рис. 2. Морфологические особенности перипартальной кардиомиопатии.
A – участки некомпактного миокарда с глубокими межтрабекулярными пространствами до субэпикардиальных отделов, ×50. B – щелевидные пространства между трабекул, ×100. C – гипертрофированные кардиомиоциты, ×400. D – контрактурные повреждения (гиперэозинофилия) и фрагментация кардиомиоцитов, ×400. E – миолиз с расширением вставочных дисков, глыбчатым распадом, безъядерные участки, ×400. F – нарушение архитектоники мышечных волокон, ×400. G – волнообразная деформация кардиомиоцитов, ×400. H – гликоген в кардиомиоцитах, PAS-реакция, ×400. A–G – окраска гематоксилином и эозином

Fig. 2. Morphological features of peripartum cardiomyopathy.
A – areas of non-compaction cardiomyopathy with deep intertrabecular spaces down to the subepicardial regions, ×50. B – slit-like spaces between trabeculae, ×100. C – cardiomyocyte hypertrophy, ×400. D – contracture damage (hypereosinophilia) and fragmentation of cardiomyocytes, ×400. E – myolysis with expanded intercalated discs, with lumpy disintegration, anuclear areas, ×400. F – disturbed muscle fiber architecture, ×400. G – wave-like deformation of cardiomyocytes, ×400. H – glycogen in cardiomyocytes, PAS reaction, ×400. A–G – H&E stain

фоидные фолликулы. В почках дистрофия эпителия проксимальных канальцев, венозное полнокровие. В стенке желудка острая язва на всю толщу слизистой оболочки. Матка с признаками субинволюции сосудов плацентарной области. Вещество полушарий большого мозга с полнокровными капиллярами. Плацента по степени зрелости соответствовала гестационному возрасту, с мелкоочаговыми афункциональными зонами, удовлетворительно выраженными компенсаторно-приспособительными изменениями и хроническим базальным децидуитом (согласно заключению аутсорсинговой лаборатории).

В патологоанатомическом диагнозе основным заболеванием явилась перипартальная кардиомиопатия, сочетанным состоянием – беременность 35 недель 6 дней, вторые преждевременные оперативные роды, экстренное кесарево сечение. К осложнениям основного заболевания отнесены признаки декомпенсации кровообращения – альвеолярный отек легких, отеки нижних конечностей, передней брюшной стенки,

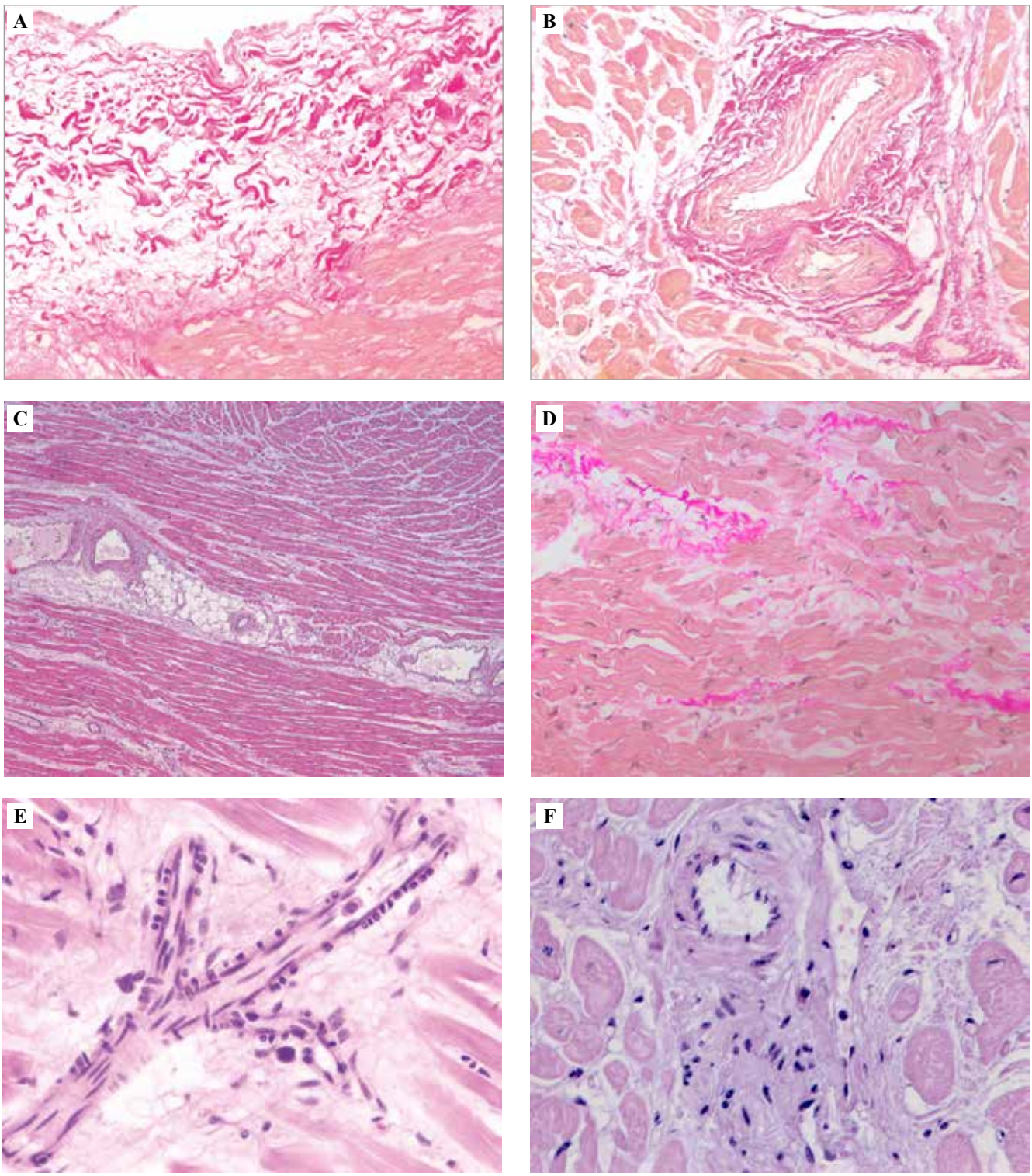


Рис. 3. Особенности стромального и сосудистого компонентов миокарда при перипартальной кардиомиопатии.
A – субэндокардиальный отек и фиброз, ×100. B – периваскулярный фиброз, ×200. C – периваскулярный липоматоз, ×100. D – диффузный фиброз стромы, ×200. E – периваскулярный отек, эндотелий сосудов и капилляров набухший, ×400. F – отдельные спазмированные сосуды, ×400. A, B, D – окраска по ван Гизону. C, E, F – окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 3. Features of the vascular and stromal components of the myocardium in peripartum cardiomyopathy.
A – subendocardial edema and fibrosis, ×100. B – perivascular fibrosis, ×200. C – perivascular lipomatosis, ×100. D – diffuse stromal fibrosis, ×200. E – perivascular edema, swollen vascular and capillary endothelium, ×400. F – individual spasmodic vessels, ×400. A, B, D – van Gieson staining. C, E, F – H&E stain

двусторонний гидроторакс, асцит, гидроперикард, гепатоспленомегалия, дистрофические изменения печени и почек, острая язва желудка, отек головного мозга. К сопутствующим заболеваниям отнесен эутиреоидный коллоидный зоб.

Обсуждение

Представленное наблюдение свидетельствует о сложностях как клинической, так и морфологической диагностики кардиомиопатии у беременных и в послеродовом периоде. По существу, диагноз «перипартальная кардиомиопатия» клинико-морфологический и основан на диагностическом комплексе дополняющих друг друга клинических признаков и типичных морфологических особенностей кардиомиопатии.

Клиническими диагностическими критериями ППКМП являются сердечная недостаточность, развивающаяся в конце беременности или в первые месяцы после родов, несомненное отсутствие заболевания миокарда до последнего месяца беременности и других причин [21–23]. Необходима ранняя диагностика патологии на основе оценки эхокардиограммы и уровня натрийуретического пептида у пациенток, жалующихся на одышку, слабость, гипотонию на последних сроках беременности и в послеродовом периоде. Дифференциальный диагноз включает нормальные физиологические проявления, осложнения течения беременности и широкий спектр экстрагенитальных заболеваний – тяжелую преэклампсию или эклампсию, острый отек легких вследствие длительного токолиза или преэклампсии, синдром эмболии околоплодными водами, тромбоэмболию легочной артерии, кардиомиопатию Такоцубо, ранее недиагностированное заболевание клапанов сердца (например, ревматическое поражение), сердечную дисфункцию вследствие ишемии, стрессовой кардиомиопатии, аритмии, бронхиальную астму, пневмонию [14, 23–25]. Госпитализация беременных и родильниц должна проводиться в специализированный центр, имеющий опыт наблюдения и лечения ППКМП. При верификации диагноза может быть использована схема BOARD-терапии, которая помимо стандартного лечения хронической сердечной недостаточности включает назначение бромокриптина, антикоагулянтов, вазодилататоров и, при необходимости, диуретиков [4].

Крайне редкой морфологической особенностью нашего наблюдения явилось сочетание ППКМП с некомпактным миокардом правого желудочка. Изолированная форма некомпактного миокарда с вовлечением правого желудочка описана в отдельных клинических сообщениях у новорожденных, у мужчин и женщин молодого и пожилого возраста [26–28]. Имеются научные клинические публикации, посвященные некомпактной кардиомиопатии левого желудочка при беременности, в послеродовом периоде, одновременно у матери и плода [29–31], описано редкое наблюдение ППКМП с формированием некомпактного миокарда левого желудочка [2].

Заключение

Наше наблюдение и данные научной литературы свидетельствуют о разнообразии вариантов поражения сердца, обусловленных беременностью. Для перипартальной кардиомиопатии характерны сочетанные признаки дилатационной кардиомиопатии с элементами некомпактного миокарда и гипертрофической кардиомиопатии. Макроскопически отмечаются ожирение сердца с дилатацией полостей, гипертрофия трабекул с углублением межтрабекулярных промежутков, утолщением некомпактного слоя миокарда. Гистологические признаки характеризуются острыми повреждениями кардиомиоцитов контрактурного и цитолитического типа, неравномерной гипертрофией кардиомиоцитов, волнообразной деформацией мышечных волокон, нарушением их гистоархитектоники, гиперплазией трабекулярного аппарата. Повреждения стромального и сосудистого компонента миокарда отражают пролонгированное развитие сердечной недостаточности с формированием ожирения сердца, фиброзом эндо- и миокарда, периваскулярным фиброзом и липоматозом. Современная клинико-морфологическая диагностика перипартальной кардиомиопатии, безусловно, должна включать молекулярно-генетический метод исследования не только для уточнения значения генетических факторов в этиологии, но и для дальнейшего репродуктивного и семейного прогноза.

Вклад авторов
Концепция и дизайн статьи – И.В. Баринова, М.Ю. Шахина, Л.В. Кактурский, Р.Г. Шмаков.
Сбор и анализ данных – М.Ю. Шахина, К.В. Агапова, И.А. Сергеева, И.В. Баринова.
Написание текста – И.В. Баринова, М.Ю. Шахина, А.В. Пырегов, Л.В. Кактурский.
Редактирование – Л.В. Кактурский, И.В. Баринова.

Author contributions
Article concept and design – I.V. Barinova, M.Yu. Shakhina, L.V. Kakturskiy, R.G. Shmakov.
Data collection and analysis – M.Yu. Shakhina, K.V. Agapova, I.A. Sergeeva, I.V. Barinova.
Wrote the paper – I.V. Barinova, M.Yu. Shakhina, A.V. Pyregov, L.V. Kakturskiy.
Edited the manuscript – L.V. Kakturskiy, I.V. Barinova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Репина М.А., Кузьмина-Крутецкая С.Р.* Кардиомиопатия как причина материнской смертности. Журнал акушерства и женских болезней. 2007;56(2):78–83. Доступно по адресу: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9517683 (получено 09.06.2026). *Repina MA. Kuzmina-Krutezkaja SR.* Maternal mortality due to cardiomyopathy. Journal of obstetrics and women's diseases. 2007;56(2):78–83 (In Russ.). Available from: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9517683 (accessed 09.06.2026).
2. *Мравян С.Р., Петрухин В.А., Пронина В.П., Капустина М.В., Палеев Ф.Н., Вишнякова М.В. (мл.) и др.* Перипартальная

кардиомиопатия в сочетании с формированием некомпактного миокарда у беременной (описание случая). Российский вестник акушера-гинеколога. 2013;13(3):83–87. Доступно по адресу: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20134531 (получено 09.06.2026).
Mravyan SR, Petrukhin VA, Pronina VP, Kapustina MV, Paleev FN, Vishnyakova MV (Jr.) et al. Peripartum cardiomyopathy concurrent with the formation of the non-compacted myocardium in a pregnant woman (a case report). Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist. 2013;13(3)3:83–87 (In Russ.). Available from: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20134531 (accessed 09.06.2026).

3. *Hilfiker-Kleiner D, Sliwa K.* Pathophysiology and epidemiology of peripartum cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol. 2014;11(6):364–70. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.37.
4. *Веселовская Н.Г., Чумакова Г.А., Николаева М.Г., Горбачева Н.С., Отт А.В.* Перипартальная кардиомиопатия: патогенез, клиника, диагностика, лечение, прогноз. Русский медицинский журнал. 2021;29(10):44–48. Доступно по адресу: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=47559912 (получено 09.06.2026).
Veselovskaya NG, Chumakova GA, Nikolaeva MG, Gorbacheva NS, Ott AV. Peripartum cardiomyopathy: pathogenesis, presentations, diagnosis, treatment, and prognosis. Russian Medical Journal. 2021;29(10):44–48 (In Russ.). Available from: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=47559912 (получено 09.06.2026).
5. *Patten IS, Rana S, Shahul S, Rowe GC, Jang C, Liu L et al.* Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. Nature. 2012;485(7398):333–8. DOI: 10.1038/nature11040.
6. *Mebazaa A, Seronde MF, Gayat E, Tibazarwa K, Anumba DOC, Akrout N et al.* Imbalanced angiogenesis in peripartum cardiomyopathy – diagnostic value of placenta growth factor. Circ J. 2017;81(11):1654–61. DOI: 10.1253/circj.CJ-16-1193.
7. *Ware JS, Li J, Mazaika E, Yasso CM, DeSouza T, Cappola TP et al.* Shared genetic predisposition in peripartum and dilated cardiomyopathies. N Engl J Med. 2016;374(3):233–41. DOI: 10.1056/NEJMoa1505517.
8. *Lee YZJ, Judge DP.* The role of genetics in peripartum cardiomyopathy. J Cardiovasc Transl Res. 2017;10(5-6):437–45. DOI: 10.1007/s12265-017-9764-y.
9. *Стрельцова А.А., Гудкова А.Я., Костарева А.А.* Некомпактный миокард: современные представления о генетических основах, клинической картине, диагностике и лечении. Терапевтический архив. 2019;91(12):90–97. DOI: 10.26442/00403660.2019.12.000142.
Streltsova AA, Gudkova AYa, Kostareva AA. Left ventricular non-compaction: contemporary view of genetic background, clinical course, diagnostic and treatment. Therapeutic Archive. 2019;91(12):90–97 (In Russ.). DOI: 10.26442/00403660.2019.12.000142.
10. *Близнюк С.А., Алексеев В.Г., Ляхова Н.Л., Либов И.А., Комарова А.Г.* Некомпактная кардиомиопатия, манифестировавшая развитием острой левожелудочковой недостаточности в раннем послеродовом периоде. Креативная кардиология. 2022;16(3):404–412. DOI: 10.24022/1997-3187-2022-16-3-404-412.
Bliznyuk SA, Alekseev VG, Lyakhova NL, Libov IA, Komarova AG. Non-compact cardiomyopathy, manifested by acute left ventricular failure in the early postpartum period. Creative Cardiology. 2022;16(3):404–412 (In Russ.). DOI: 10.24022/1997-3187-2022-16-3-404-412.
11. *Гайсенок О.В., Курносов П.А., Бернс С.А.* Некомпактный миокард левого желудочка. Архив патологии. 2018;8(4):47–53. DOI: 10.17116/patol201880447.
Gaisenok OV, Kurnosov PA, Berns SA. Left ventricular noncompaction. Archive of pathology. 2018;8(4):47–53 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201880447.
12. *Lasica R, Asanin M, Vukmirovic J, Maslac L, Savic L, Zdravkovic M et al.* What do we know about peripartum cardiomyopathy? Yesterday, today, tomorrow. Int J Mol Sci. 2024;25(19):10559. DOI: 10.3390/ijms251910559.
13. *Shrikhande L, Shrikhande A, Shrikhande B.* Peripartum cardiomyopathy. J Obstet Gynaecol India. 2022;72(5):377–81. DOI: 10.1007/s13224-022-01621-2.
14. *Mubarik A, Chippa V, Carlson K, Iqbal AM.* Postpartum cardiomyopathy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. PMID: 30521191.
15. *Bauersachs J, Arrigo M, Hilfiker-Kleiner D, Veltmann C, Coats AJ, Crespo-Leiro MG et al.* Current management of patients with severe acute peripartum cardiomyopathy: practical guidance from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Study Group on peripartum cardiomyopathy. Eur J Heart Fail. 2016;18(9):1096–105. DOI: 10.1002/ejhf.586.
16. *Prameswari HS, Kamarullah W, Pranata R, Putra ICS, Undarsa AC, Iqbal M et al.* Meta-analysis of cardiac magnetic resonance in prognosticating left ventricular function in peripartum cardiomyopathy. ESC Heart Failure. 2024;12(1):304–15. DOI: 10.1002/ehf2.15024.
17. *Koczo A, Acharya D, Ozbay B, Alharethi R, Givertz MM, Elkayam U et al.* CMR and adverse clinical outcomes in peripartum cardiomyopathy. Am Heart J Plus. 2024;48:100484. DOI: 10.1016/j.ahjo.2024.100484.
18. *Khan A, Paré E, Shah S.* Peripartum cardiomyopathy: a review for the clinician. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2018;20(11):91. DOI: 10.1007/s11936-018-0690-3.
19. *Hilfiker-Kleiner D, Haghikia A, Berliner D, Vogel-Claussen J, Schwab J, Franke A et al.* Bromocriptine for the treatment of peripartum cardiomyopathy: a multicentre randomized study. Eur Heart J. 2017;38(35):2671–9. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx355.
20. *Кактурский Л.В.* Внезапная сердечная смерть (клиническая морфология). Москва: Медицина для всех, 2000. 127 с.
Kakturskiy LV. Sudden cardiac death (clinical morphology). Moscow: Meditsina dlya vsekh, 2000. 127 p. (In Russ.).
21. *Бегиев Б., Ураимов Ж., Жанбаева А.К., Иметова Ж.Б., Абдуллаева Ж.Д.* Клиническое наблюдение перипартальной кардиомиопатии. Бюллетень науки и практики. 2022;8(1):101–106. DOI: 10.33619/2414-2948/74/14.
Begiev B, Uraimov Zh, Zhanbaeva AK, Imetova ZhB, Abdullaeva ZhD. Clinical observation of peripartum cardiomyopathy. Bulletin of Science and Practice. 2022;8(1):101–106 (In Russ.). DOI: 10.33619/2414-2948/74/14.
22. *Davis MB, Arany Z, McNamara DM, Goland S, Elkayam U.* Peripartum cardiomyopathy. JACC state-of-the-art review.

J Am Coll Cardiol. 2020;75(2):207–21. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.11.014.

23. *DeFilippis EM, Haythe JH, Walsh MN, Kittleson MM.* Intersection of heart failure and pregnancy: beyond peripartum cardiomyopathy. Circ Heart Fail. 2021;14(5):e008223. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008223.
24. *Yaméogo NV, Samadoulougou AK, Kagambèga LJ, Kologo KJ, Millogo GRC, Thiam A et al.* Maternal and fetal prognosis of subsequent pregnancy in black African women with peripartum cardiomyopathy. BMC Cardiovasc Disord. 2018;18(1):119. DOI: 10.1186/s12872-018-0856-7.
25. *LaValle TA, Ernst RM, Robbie A.* Peripartum cardiomyopathy and takotsubo cardiomyopathy: rare contributors to cardiac causes of maternal mortality. Cureus. 2024;16(12):e76621. DOI: 10.7759/cureus.76621.
26. *Saglam M, Saygin H, Kozan H, Ozturk E, Mutlu H.* Noncompaction of ventricular myocardium involving the right ventricle. Korean Circ J. 2015;45(5):439–41. DOI: 10.4070/kcj.2015.45.5.439.
27. *Huang PP, Tang YX, Huang XS.* A rare case of isolated right ventricular non-compaction with the novel *TTN* mutation. Front Cardiovasc Med. 2022;9:845973. DOI: 10.3389/fcvm.2022.845973.
28. *Huo Q, Liang L, Ding X, Pang M, Zhao Y, Zhang H et al.* Isolated right ventricular noncompaction caused ventricular tachycardia and pulmonary embolism. Ann Noninvasive Electrocardiol. 2020;25(5):e12731. DOI: 10.1111/anec.12731.
29. *Asoglu R, Turkmen S, Akturk E, Afsin A.* Peripartum noncompaction cardiomyopathy: new diagnosed after pregnancy. Med Science. 2018;7(3):694–6. DOI: 10.5455/medscience.2017.07.8803.
30. *Plastiras SC, Pamboucas C, Toumanidis S.* Noncompaction cardiomyopathy and pregnancy: an alarming coexistence ending in a favourable outcome. Exp Clin Cardiol. 2012;17(3):136–8. PMID: 23620702.
31. *O'Connor E, Saylor L, O'Nan S, Schnettler W.* Pregnancy complicated by non-compaction cardiomyopathy in the mother and fetus: a case report of both maternal management and prenatal diagnosis. Obstet Gynecol Cases Rev. 2023;10:238. DOI: 10.23937/2377-9004/1410238.

Информация об авторах

Ирина Владимировна Баринова – доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского, профессор кафедры патологической анатомии РМАНПО.

Марина Юрьевна Шахина – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Лев Владимирович Кактурский – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Карина Валерьевна Агапова – заведующая патологоанатомическим отделением Люберецкой ОКБ.

Ирина Александровна Сергеева – заведующая отделением анестезиологии и реанимации Щелковского перинатального центра.

Алексей Викторович Пырегов – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского по анестезиологии и реаниматологии, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии Института усовершенствования врачей НМХЦ им. Н.И. Пирогова.

Роман Георгиевич Шмаков – доктор медицинских наук, профессор РАН, директор МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Author information

Irina V. Barinova – Dr. Sci. (Med.), 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

Marina Yu. Shakhina – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Pathology Department, Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology.
https://orcid.org/0000-0002-4599-4446

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

Karina V. Agapova – Head of the Department of Anatomic Pathology, Lyubertsy Regional Clinical Hospital.
https://orcid.org/0009-0001-4061-9540

Irina A. Sergeeva – Head of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, Shchelkovo Perinatal Center.
https://orcid.org/0009-0007-6545-3050

Alexey V. Pyregov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director of Anesthesiology and Resuscitation, V.I. Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology; Professor, Department of Anesthesiology and Resuscitation, Institute for Advanced Medical Studies, Pirogov National Medical and Surgical Center.
https://orcid.org/0000-0001-8382-9671

Roman G. Shmakov – Dr. Sci. (Med.), Professor of the Russian Academy of Sciences, Director of the V.I. Krasnopolsky Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology; Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Doctors Advanced Training, Moscow Regional Research and Clinical Institute.
https://orcid.org/0000-0002-2206-1002

© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.77-82 УДК: 616-006.66

Феномен SARIFA как дополнительный предиктор агрессивного течения колоректального рака

Л.М. Михалева[1], А.К. Цуцаев[2], З.В. Гиоева[1], Н.К. Шахпазян[1], Н.П. Чижиков[3], А.А. Епхиев[1,2], А.К. Конюкова[1], В.В. Печникова[1]

[1] ГНЦ РФ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия
[2] ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Северная Осетия – Алания, Владикавказ, Россия
[3] ГБУЗ города Москвы Московский многопрофильный научно-клинический центр имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* SARIFA (Stroma AReactive Invasion Front Area, зоны фронта инвазии с ареактивной стромой) – относительно новый гистологический маркер неблагоприятного прогноза при колоректальном раке, характеризующийся инвазией опухолевых клеток в прилежащую жировую клетчатку без формирования десмопластической стромальной реакции на инвазивном фронте. Приводим собственное клиническое наблюдение, демонстрирующее ассоциацию SARIFA с другими признаками агрессивного фенотипа опухоли.
Материалы и методы. Пациентка 75 лет с верифицированной аденокарциномой ректосигмоидного отдела. Выполнена лапароскопическая резекция сигмовидной кишки. При патоморфологическом исследовании операционного материала выявлена умеренно дифференцированная аденокарцинома с инвазией в жировую клетчатку (pT3). Ключевой особенностью явилось отсутствие десмопластической стромы в зоне инвазивного фронта – фенотип SARIFA. Дополнительно обнаружены лимфоваскулярная инвазия (как мелких, так и крупных сосудов, интра- и экстрамурально), периневральная инвазия, низкий уровень стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (5%), умеренная степень опухолевого почкования (Bd2). Регионарные лимфатические узлы без метастазов (0/12, pN0). Края резекции свободны (R0). Несмотря на стадию pT3N0M0 (II стадия), наличие двух факторов неблагоприятного прогноза (включая SARIFA) обосновывало рассмотрение адъювантной химиотерапии, однако из-за позднего обращения (2,5 месяца после операции) от нее воздержались.
Заключение. Данный клинический случай подтверждает, что SARIFA может служить дополнительным прогностическим маркером агрессивного фенотипа колоректального рака, ассоциированным с лимфоваскулярной и периневральной инвазией, высоким уровнем опухолевого почкования и низким уровнем стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов даже при отсутствии метастазов в лимфатические узлы. Включение оценки SARIFA в рутинную патологоанатомическую практику может улучшить стратификацию пациентов для принятия решений об адъювантной терапии.

Ключевые слова: колоректальный рак, SARIFA, десмоплазия, опухолевое почкование, прогноз, клинический случай

Для корреспондеции: Зарина Владиславовна Гиоева. E-mail: gioeva_z@mail.ru

Для цитирования: Михалева Л.М., Цуцаев А.К., Гиоева З.В., Шахпазян Н.К., Чижиков Н.П., Епхиев А.А., Конюкова А.К., Печникова В.В. Феномен SARIFA как дополнительный предиктор агрессивного течения колоректального рака. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):77–82. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.77-82.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» № 126031018585-0 (№ FURG-2026-0027).

Статья поступила 20.07.2026. **Получена после рецензирования** 17.08.2026. **Принята в печать** 05.10.2026.

SARIFA as an additional predictor of aggressive colorectal cancer

L.M. Mikhaleva[1], A.K. Tsutsaev[2], Z.V. Gioeva[1], N.K. Shakhpazyan[1], N.P. Chizhikov[3], A.A. Ephiev[1,2], A.K. Konyukova[1], V.V. Pechnikova[1]

[1] Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia
[2] Republican Oncological Dispensary of the Republic of North Ossetia–Alania, Vladikavkaz, Russia
[3] Moscow Botkin Multidisciplinary Scientific-Clinical Center, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction*. SARIFA (Stroma AReactive Invasion Front Area) is a relatively new histological marker of poor prognosis in colorectal cancer. Positive SAFIRA is characterized by tumor cell invasion into adjacent adipose tissue without forming a desmoplastic stromal reaction at the invasive front. We present a clinical case demonstrating an association of SARIFA with other features of an aggressive tumor phenotype.
Material and methods. A 75-year-old female patient with confirmed adenocarcinoma of the rectosigmoid colon underwent laparoscopic resection of the sigmoid colon. Pathological examination of the surgical specimen revealed moderately differentiated adenocarcinoma with fat invasion (pT3). A key feature was the absence of desmoplastic stroma in the invasive front zone (the SARIFA phenotype). Additionally, we detected the following features: lymphovascular invasion (both small and large vessels, intra- and extramural), perineural invasion, a low level of stromal tumor-infiltrating lymphocyte score of 5%, and a moderate degree of tumor budding (Bd2). Regional lymph nodes showed no metastases (0/12, pN0), and resection margins were free (R0). Despite the pT3N0M0 stage (stage II), the presence of two unfavorable prognostic factors (including SARIFA) supported consideration of adjuvant chemotherapy; however, due to late presentation (2.5 months after surgery), it was ultimately withheld.
Conclusion. This clinical case confirms that SARIFA can serve as an additional prognostic marker for the aggressive colorectal cancer phenotype, associated with lymphovascular and perineural invasion, high tumor budding, and low sTIL levels, even in the absence of lymph node metastases. Incorporating SARIFA assessment into routine pathology practice may improve patient stratification for adjuvant therapy decisions.

Keywords: colorectal cancer, SARIFA, desmoplasia, tumor budding, prognosis, clinical case

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

For citation: Mikhaleva L.M., Tsutsaev A.K., Gioeva Z.V., Shakhpazyan N.K., Chizhikov N.P., Ephiev A.A., Konyukova A.K., Pechnikova V.V. SARIFA as an additional predictor of aggressive colorectal cancer. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):77–82 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.77-82.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

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. 126031018585-0 (No. FURG-2026-0027).

Received 20.07.2026. **Received in revised form** 17.08.2026. **Accepted** 05.10.2026.

Введение

Колоректальный рак (КРР) остается одной из ведущих причин смертности по онкологическим причинам. Прогноз при КРР определяется не только классической стадией TNM (tumor, nodus, metastasis), но и рядом дополнительных гистологических параметров, таких как инвазия сосудов, периневральная инвазия, опухолевое почкование, уровень стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (stromal tumor-infiltrating lymphocytes, sTIL) и т.д. [1–3].

В последние годы внимание исследователей привлекает феномен SARIFA (stroma areactive invasion front area, зоны фронта инвазии с ареактивной стромой) – тип инвазивного роста, при котором опухолевые клетки проникают в прилежащую жировую клетчатку без формирования десмопластической стромальной реакции [4]. В норме десмоплазия – фиброзная реакция стромы на инвазию – считается защитным механизмом, ограничивающим распространение опухоли. Отсутствие такой реакции может свидетельствовать о способности раковых клеток избегать стромальной активации, возможно, за счет специфического профиля экспрессии матриксных металлопротеиназ или нарушения сигнальных путей [2].

В крупных когортных исследованиях SARIFA ассоциирован с более низкой общей и безрецидивной выживаемостью при КРР, причем эта ассоциация сохранялась в многофакторном анализе независимо от стадии TNM, степени дифференцировки и инвазии лимфатических узлов [5].

По данным валидационного исследования аденокарцином желудка и кардиоэзофагеального перехода (n=392), прогностическая значимость SARIFA сопоставима с таковой N+ статуса: в многофакторной модели SARIFA-позитивность ассоциировалась с канцероспецифической выживаемостью с относительным

риском (ОР) 1,85 (95%-й доверительный интервал [ДИ] 1,30–2,62; p=0,001) при ОР 2,33 для pN1 и 2,41 для pN3. Отсутствие десмоплазии может облегчать диссеминацию опухолевых клеток и ассоциировано с неблагоприятным исходом [6]. Ряд исследований показал, что SARIFA является независимым прогностическим фактором, сопоставимым по значимости с инвазией лимфатических узлов [7].

Мы представляем клиническое наблюдение пациентки с КРР II стадии, у которой фенотип SARIFA сочетался с несколькими другими признаками агрессивного биологического поведения опухоли, что повлияло на обсуждение адъювантного лечения.

Клиническое наблюдение

Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНЦХ имени академика Б.В. Петровского (протокол № 5 от 23.05.2025).

Пациентка В., 75 лет. Из анамнеза известно, что в сентябре 2024 года при плановом обследовании выявлено снижение уровня гемоглобина (104 г/л). При колоноскопии в ректосигмоидном отделе обнаружена опухоль; при патологоанатомическом анализе биопсийного материала была диагностирована умеренно дифференцированная аденокарцинома кишечного типа. Пациентка обратилась в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина для определения тактики лечения.

Данные инструментального обследования. Компьютерная томография грудной клетки и брюшной полости (08.11.2024): единичный субплевральный очаг в S6 левого легкого до 0,6×0,5 см неясной природы (динамическое наблюдение); кисты левой почки (Bosniak I); гемангиома тела Th10 до 1,8 см; без признаков отдаленных метастазов. Магнитно-резонансная томография органов малого таза (12.11.2024): опухоль сигмовидной кишки протяженностью 57 мм, максимальная глубина инвазии около 2–3 мм (T3b), регионарные лимфатические узлы без признаков метастатического поражения (N0), экстрамуральная сосудистая инвазия (EMVI) не выявлена, мезоректальная фасция не вовлечена (CRM–). Заключение: стадия T3bN0Mx.

Лабораторные данные: гемоглобин 104 г/л; онкомаркеры: СА 19-9 – 16,4 Ед/мл (референс <34), РЭА – 3,2 нг/мл (<5). Коагулограмма, биохимические показатели без значимых отклонений.

Лечение. После обсуждения на мультидисциплинарном консилиуме выполнена лапароскопическая резекция сигмовидной кишки. Послеоперационный период без осложнений.

Результаты прижизненного патологоанатомического исследования операционного материала. При макроскопическом изучении резецированного фрагмента толстой кишки длиной 14 см на расстоянии 4 см от одного и 8 см от другого края резекции определялся фокус опухоли размерами 5,5×1,5 см со сглаженной слизистой оболочкой с грязно-серыми наложениями по краям, стенка кишки в этой зоне утолщена и уплотнена. В параколической жировой клетчатке обнаружено 12 лимфатических узлов размерами от 0,5×0,3 см до 0,9×0,5 см бледно-синюшного цвета, однородного вида на разрезе. При микроскопическом исследовании была диагностирована умеренно дифференцированная аденокарцинома кишечного типа (Всемирная организация здравоохранения, 2019, код по Международной классификации болезней для онкологии 8144/3), инфильтрирующая подслизистый слой, мышечную пластинку и врастающая в прилежащую жировую клетчатку (pT3). Чрезвычайно важным является микроскопическая оценка феномена SARIFA: на инвазивном фронте, в зоне контакта опухолевых клеток с жировой тканью, подтверждено отсутствие десмопластической стромы. Обращает на себя внимание то, что опухолевые клетки, инфильтрируя жировые дольки в виде мелких гнезд, тяжей и одиночных клеток, не вызывают выраженной стромальной реакции (рис. 1, 2). Наряду с этим проведена также оценка дополнительных гистологических параметров.

Лимфоваскулярная инвазия (ЛВИ): обнаружена инвазия как мелких сосудов (капилляров), так и крупных – интрамуральная и экстрамуральная.

Периневральная инвазия (ПНИ): выявлена.

Опухолевое почкование: умеренная степень – Bd2 (5–9 почкующихся клеток в одном поле зрения при ×20).

sTIL: низкий уровень – 5% (International TIL Working Group criteria) [8].

Тканевая реакция: не обнаружена.

Опухолевые депозиты в жировой клетчатке: не выявлены (Td0).

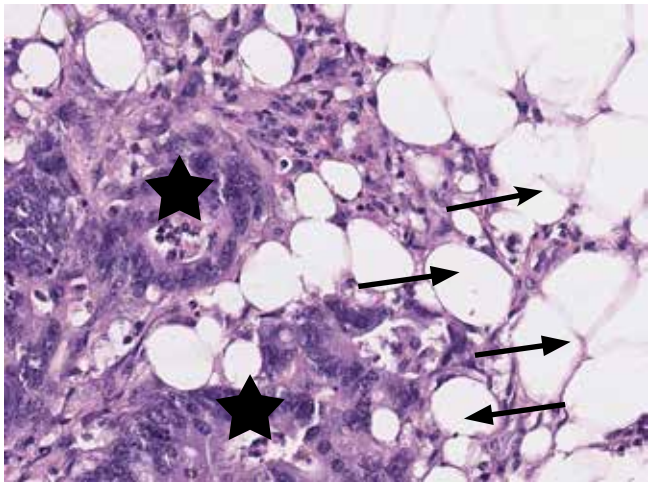


Рис. 1. Инвазивный фронт опухоли. Отсутствие десмопластической стромальной реакции в зоне контакта аденокарциномы (опухолевые клетки, отмечены *звездочками*) с жировой клетчаткой (жировые клетки указаны *стрелками*). Окраска гематоксилином и эозином, ×100

Fig. 1. Invasive tumor front. Absence of a desmoplastic reaction at the interface between the adenocarcinoma (tumor cells marked with *asterisks*) and adipose tissue (adipocytes indicated by *arrows*). H&E stain, ×100

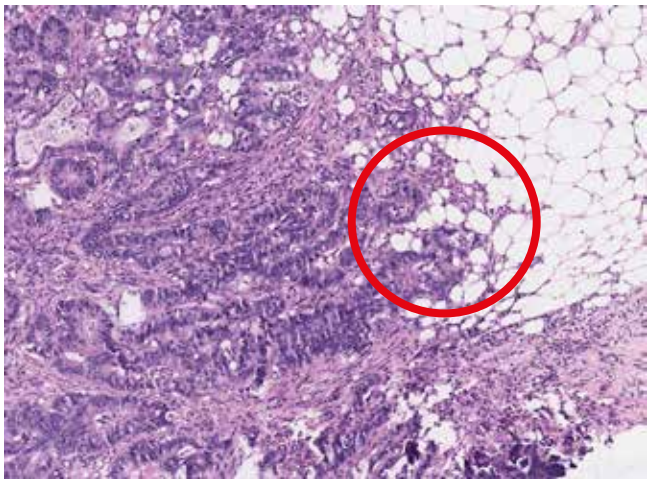


Рис. 2. Инвазивный фронт опухоли. Отсутствие десмопластической стромальной реакции в зоне контакта аденокарциномы с жировой клетчаткой (*красный круг*). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 2. Invasive tumor front. No desmoplastic stromal reaction in the area of adenocarcinoma–fat tissue contact (*red circle*). H&E stain, ×400

Края резекции: проксимальный и дистальный отрицательные (R0).

Регионарные лимфатические узлы: все исследованные 12 лимфатических узлов без метастазов (pN0), в некоторых из них выявлен гистиоцитоз синусов.

Заключительный патологоанатомический диагноз: аденокарцинома сигмовидной кишки, умеренно дифференцированная, pT3 pN0 (0/12) (клинически M0), R0, ЛВИ (+), ПНИ (+), Bd2, sTIL 5%, SARIFA-положительный фенотип.

В нашем наблюдении SARIFA сопровождался ЛВИ, ПНИ, умеренным почкованием (Bd2) и низкими sTIL. Это не случайно: отсутствие десмоплазии может облегчать проникновение опухолевых клеток в микрососуды и нервы. Кроме того, низкий уровень TIL может отражать иммунологическую «холодность» микроокружения, что также коррелирует с агрессивным течением [9].

Клинические последствия. Несмотря на формально благоприятную стадию II (pT3N0M0), риск рецидива у данной пациентки нельзя считать низким. Согласно клиническим рекомендациям, при pT3N0M0 адъювантная химиотерапия рекомендуется при наличии факторов неблагоприятного прогноза (≥G3, лимфатическая, сосудистая или периневральная инвазия, менее 12 изученных лимфатических узлов, tumor budding BD3, повышенный уровень РЭА, позитивные смывы с брюшины, послеоперационная циркулирующая опухолевая ДНК), тогда как при pT4N0 она показана независимо от дополнительных факторов [10]. Хотя SARIFA в настоящее время не входит в стандартные протоколы, растущий объем данных позволяет рассматривать его как дополнительный фактор для обсуждения адъювантного лечения.

В данном случае, учитывая возраст пациентки, наличие двух и более факторов неблагоприятного прогноза (ЛВИ, ПНИ, Bd2, низкие sTIL, SARIFA), обсуждалась адъювантная химиотерапия по схеме XELOX. Тем не менее из-за позднего обращения (2,5 месяца после операции) от химиотерапии решено было воздержаться, рекомендовано динамическое наблюдение с обследованием каждые 3 месяца в течение первых 2 лет.

Обсуждение

Данный клинический случай представляет значительный интерес с точки зрения несоответствия между формально благоприятной стадией заболевания (II стадия, pT3N0M0 по TNM) и наличием гистопатологических признаков, традиционно ассоциирующихся с агрессивным фенотипом и высоким риском рецидивирования. Данное наблюдение иллюстрирует ключевую проблему современной онкоколопроктологии: ограниченность традиционной стадии TNM как единственного предиктора течения заболевания, а также необходимость углубленного патоморфологического анализа для стратификации пациентов с локализованным КРР.

В структуре выявленных неблагоприятных прогностических факторов обращает на себя внимание лимфоваскулярная и периневральная инвазия. Согласно данным метаанализов, наличие ЛВИ при КРР II стадии повышает риск метастазирования в 2,5–3 раза, а ПНИ ассоциируется не только с гематогенной диссеминацией, но и с локальными и регионарными рецидивами вследствие распространения опухоли по нервным стволам [1, 4]. В клинической практике наличие хотя бы одного из этих признаков является основанием для обсуждения адъювантной химиотерапии даже при отсутствии поражения лимфатических узлов.

Особого внимания заслуживает феномен умеренного опухолевого почкования. В соответствии с Международным консенсусом по опухолевому почкованию (International Tumor Budding Consensus Conference, 2016) умеренное почкование (Bd2, 5–9 клеток в поле зрения при большом увеличении) рассматривается как независимый фактор неблагоприятного прогноза при КРР ранних стадий. Показано, что даже при pT3N0 фенотип с высоким уровнем почкования демонстрирует кривую безрецидивной выживаемости, сравнимую с таковой при III стадии [8]. Механизм этой агрессивности связан с эпителиально-мезенхимальным переходом, который обеспечивает клеткам способность к инвазии и формированию циркулирующих опухолевых клеток.

Низкий уровень sTIL в данном случае является еще одним звеном в цепи неблагоприятных признаков. Высокий уровень sTIL, напротив, коррелирует с микросателлитной нестабильностью и благоприятным

ответом на иммунотерапию, тогда как низкий sTIL характерен для микросателлитно стабильных опухолей с более агрессивным течением. Сочетание низкого sTIL с ЛВИ и ПНИ формирует фенотип иммунологически «холодной» опухоли, что потенциально ограничивает эффективность как адъювантной химиотерапии, так и современных иммуноонкологических подходов.

Феномен SARIFA является, пожалуй, наиболее примечательной и наименее изученной находкой в данном наблюдении. Этот феномен характеризуется прямым контактом между опухолевыми клетками на инвазивном фронте и адипоцитами окружающей жировой ткани без участия реактивного стромального ответа. Впервые описанный при раке желудка, SARIFA в последние годы получил подтверждение своей прогностической значимости и при КРР, особенно при локализованных формах [1]. Отсутствие десмопластической реакции стромы указывает на способность опухоли к «молчаливому» распространению через жировую клетчатку, избегая иммунного надзора. Важно подчеркнуть, что в отечественной патологоанатомической практике SARIFA пока не является рутинным маркером и, как правило, не включается в стандартные протоколы описания операционного материала. Данный клинический случай обосновывает необходимость внедрения оценки SARIFA в алгоритм патоморфологического исследования при КРР, по крайней мере в специализированных онкологических центрах.

С практической точки зрения совокупность описанных признаков (ЛВИ, ПНИ, умеренное почкование, низкий sTIL, SARIFA) переводит пациентку с формальной II стадией в группу очень высокого риска рецидива. По данным ряда когортных исследований, при наличии трех и более факторов агрессии (без учета SARIFA) 5-летняя безрецидивная выживаемость при pT3N0M0 снижается с 85% до 45–50%. Включение SARIFA в этот расчет, вероятно, утяжеляет прогноз еще больше.

Заключение

Феномен SARIFA (отсутствие десмоплазии на инвазивном фронте при врастании опухоли в жировую клетчатку) является многообещающим дополнительным прогностическим маркером при колоректальном раке. Представленный клинический случай демонстрирует, что SARIFA может сочетаться с другими признаками агрессивного фенотипа (лимфоваскулярная, перineвральная инвазия, умеренное почкование, низкий уровень стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов) даже при отсутствии метастазов в лимфатические узлы. Патологоанатомам следует обращать внимание на этот признак при описании инвазивного фронта, а клиницистам учитывать его при стратификации пациентов со II стадией для решения вопроса об адъювантной терапии. Требуются дальнейшие проспективные исследования для валидации SARIFA в качестве стандартного прогностического биомаркера.

Вклад авторов
Концепция и дизайн статьи – Л.М. Михалева, А.А. Епхиев, Н.К. Шахпазян.
Сбор и анализ данных – А.К. Конюкова, В.В. Печникова.
Написание текста – А.К. Цуцаев.
Редактирование – Л.М. Михалева, З.В. Гиоева, А.К. Конюкова.

Author contributions
Article concept and design – L.M. Mikhaleva, A.A. Ephiev, N.K. Shakhpazyan.
Data collection and analysis – A.K. Konyukova, V.V. Pechnikova.
Wrote the paper – A.K. Tsutsaev.
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, Z.V. Gioeva, A.K. Konyukova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Ограничения. Наше наблюдение – единичный случай, что не позволяет делать окончательные выводы о прогностической роли SARIFA. Тем не менее оно иллюстрирует важность тщательной морфологической оценки инвазивного фронта и необходимость включения SARIFA в протоколы исследования операционного материала при КРР.

Limitations. Our observation is a single case that precludes definitive conclusions about SARIFA prognostic role. Nevertheless, it illustrates the importance of careful morphological assessment of the invasive front and the necessity to include SARIFA in protocols for examining surgical specimens in colorectal cancer (CRC).

Литература/References

1. *Aldyab M, Pacheco RR, Najjar S, Rand JV, Lee H.* High-yield areas to grade tumor budding in colorectal cancer: a practical approach for pathologists. Ann Diagn Pathol. 2023;63:152085. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2022.152085.
2. *Martin B, Grosser B, Kempkens L, Miller S, Bauer S, Dhillon C et al.* Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA) – a new easily to determine biomarker in colon cancer – results of a retrospective study. Cancers (Basel). 2021;13(19):4880. DOI: 10.3390/cancers13194880.
3. *Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. Histopathology. 2020;76(2):182–88. DOI: 10.1111/his.13975.
4. *Hu G, Li L, Hu K.* Clinical implications of perineural invasion in patients with colorectal cancer. Medicine (Baltimore). 2020;99(17):e19860. DOI: 10.1097/MD.0000000000019860.
5. *Xiao H, Weng Z, Sun K, Shen J, Lin J, Chen S et al.* Predicting 5-year recurrence risk in colorectal cancer: development and validation of a histology-based deep learning approach. Br J Cancer. 2024;130(6):951–60. DOI: 10.1038/s41416-024-02573-2.
6. *Ulase D, Behrens HM, Röcken C.* Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA) predict poor survival in adenocarcinomas of the stomach and gastrooesophageal junction: a validation study. Virchows Arch. 2024;485(3):527–34. DOI: 10.1007/s00428-024-03826-4.
7 *Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal ID.* Perineural invasion is a strong prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review. Am J Surg Pathol. 2016;40(1):103–12. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000518.

8. *Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H et al.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. Mod Pathol. 2017;30(9):1299–311. DOI: 10.1038/modpathol.2017.46.
9. *Reitsam NG, Offermans K, Simons CCJM, Grosser B, Zimmermann J, Grabsch HI et al.* Prognostic and predictive value of SARIFA-status within molecular subgroups of colorectal cancer: insights from the Netherlands Cohort Study. Am J Surg Pathol. 2025;49(9):956–69. DOI: 10.1097/PAS.0000000000002408.
10. Ассоциация колопроктологов России, Ассоциация онкологов России, Российское общество клинической онкологии, Российское общество специалистов по колоректальному раку. Рак ободочной кишки и ректосигмоидного перехода: клинические рекомендации. ID: 396_4. 2025. Доступно по адресу: https://medvestnik.ru/cr/396_4.html (получено 21.09.2026).
Russian Association of Coloproctologists, Russian Association of Oncologists, Russian Society of Clinical Oncology, Russian Society of Colorectal Cancer Specialists. Colon and rectosigmoid junction cancer: clinical guidelines (In Russ.). ID: 396_4. 2025. Available from: https://medvestnik.ru/cr/396_4.html (accessed 21.09.2026).

Информация об авторах

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель по патологической анатомии, заведующая лабораторией клинической морфологии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Аслан Казбекович Цуцаев – врач-патологоанатом патологоанатомической лаборатории Республиканского онкологического диспансера РСО – Алания.

Зарина Владиславовна Гиоева – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией патоморфологии социально значимых заболеваний РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

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

Никита Павлович Чижиков – заведующий патологоанатомическим отделением ММНКЦ им. С.П. Боткина.

Александр Алибекович Епхиев – кандидат медицинских наук, заведующий отделением НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского» в РСО – Алания, заведующий патологоанатомическим отделением Республиканского онкологического диспансера РСО – Алания.

Александра Константиновна Конюкова – старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

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

Author information

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director in Anatomic Pathology, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery.
https://orcid.org/0000-0003-2052-914X

Aslan K. Tsutsaev – Pathologist, Pathology Laboratory, Republican Oncological Dispensary of the Republic of North Ossetia–Alania.
https://orcid.org/0009-0005-8645-4365

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Pathomorphology of Diseases of Public Health Importance, Petrovsky National Research Centre of Surgery.
https://orcid.org/0000-0002-5456-8692

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

Nikita P. Chizhikov – Head of the Pathology Department, Moscow Botkin Multidisciplinary Scientific-Clinical Center.
https://orcid.org/0009-0004-0584-8657

Alexander A. Ephiev – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Russian National Research Centre of Surgery (RSO-Alania branch), Head of the Pathology Department, Republican Oncological Dispensary of the Republic of North Ossetia–Alania.
https://orcid.org/0000-0002-9126-2019

Alexandra K. Konyukova – Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery.
https://orcid.org/0000-0001-5925-5196

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

© Коллектив авторов, 2026
DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94 УДК: 57.086.1

Оптимизация пробоподготовки гистологических образцов тканей *Danio rerio* с применением изопропанола и минерального масла

Н.И. Сафонова[1], Д.М. Долматова[2], В.С. Фадеев[2], Г.М. Алипер[2], Ю.Ю. Силаева[1], Ю.П. Байкова[1]

[1] ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия
[2] ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Рыбы *Danio rerio* являются одним из популярных объектов для проведения биомедицинских исследований – как фундаментальных, так и прикладных. Они удобны прежде всего простотой и относительной дешевизной содержания, наличием отработанных протоколов моделирования патологических состояний, относительной легкостью наблюдения за стадиями эмбрионального развития. Для оценки фенотипических проявлений патологий используют разные методы, в частности анализ гистологических срезов. Тем не менее проведение адекватного патоморфологического и патогистологического анализа возможно только при наличии препарата, лишенного артефактов. При этом качество в значительной степени определяется выбранной схемой пробоподготовки, включающей этапы фиксации, декальцинации и гистологической проводки исследуемых образцов. В литературе приведены методики подготовки гистологических препаратов *Danio rerio*, однако обращает на себя внимание отсутствие общепринятых протоколов пробоподготовки для различных тканей *Danio rerio*. В связи с этим целями настоящей работы были проверка применимости ряда существующих протоколов фиксации, декальцинации и стандартной проводки, а также адаптация режимов пробоподготовки под ручную проводку, основанную на использовании изопропанола и минерального масла, и определение оптимальных схем изготовления гистологических препаратов *Danio rerio*.
Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны взрослые самцы и самки (до нереста и после него) *Danio rerio* дикого типа возраста 7 месяцев.
Результаты. Проведенное исследование показало, что оптимальным фиксатором для любых образцов *Danio rerio* является 10% нейтральный забуференный формалин, за исключением исследования брюшной полости половозрелых самок до нереста. Для образцов, содержащих костную ткань, предпочтительна 24-часовая хелатная декальцинация с использованием 0.5М раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0.
Заключение. Гистологическая проводка с использованием изопропанола и минерального масла показала хорошие результаты и может быть признана эффективной и безопасной альтернативой классической проводке через этанол и ксилол в гистологии рыб.

Ключевые слова: *Danio rerio*, гистология, фиксация, декальцинация, изопропанол, минеральное масло

Для корреспонденции: Юлия Павловна Байкова. E-mail: baykjulia@gmail.com

Для цитирования: Сафонова Н.И., Долматова Д.М., Фадеев В.С., Алипер Г.М., Силаева Ю.Ю., Байкова Ю.П. Оптимизация пробоподготовки гистологических образцов тканей *Danio rerio* с применением изопропанола и минерального масла. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):83–94. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-14-00373).

Статья поступила 02.06.2026. **Получена после рецензирования** 11.06.2026. **Принята в печать** 22.06.2026.

Optimization of sample preparation protocol for histological analysis of *Danio rerio* tissues using isopropanol and mineral oil

N.I. Safonova[1], D.M. Dolmatova[2], V.S. Fadeev[2], G.M. Aliper[2], Yu.U. Silaeva[1], Iu.P. Baikova[1]

[1] Institute of Gene Biology, Moscow, Russia
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction. Danio rerio* is a common model in both fundamental and applied biomedical research because it is cost effective and easy to maintain. Moreover, published and validated protocols are available

to model various pathologies, and embryonic development can be assessed at any stage. Pathological phenotypes can be analyzed using various methods, including histology. However, adequate pathomorphological and pathohistological analyses require high-quality artefact-free specimens, whose quality largely depends on preparation protocol, including fixation, decalcification, and histological processing. Although there exist various protocols for preparing *Danio rerio* specimens, standardized protocols for different *Danio rerio* tissues have not yet been developed. Thus, this study aimed to analyze the applicability of existing fixation, decalcification, and processing protocols, adapt them for manual processing with isopropanol and mineral oil, and identify optimal protocols for histological preparation of various *Danio rerio* tissues.
Materials and methods. We used adult 7-month-old male and female (before and after spawning) wild-type *Danio rerio*.
Results. 10% NBF is an optimal universal fixative for examining all *Danio rerio* tissues, except for the abdominal ones of sexually mature female fish before spawning. For specimens containing bone tissue, a 24-hour chelation decalcification protocol using 0.5M EDTA (pH 8.0) is preferred.
Conclusion. Histological processing using isopropanol and mineral oil has yielded satisfactory results and may serve as an effective and safe alternative to the standard ethanol- and xylene-based processing protocols in histological studies of *Danio rerio* tissues.

Keywords: *Danio rerio*, histology, fixation, decalcification, isopropanol, mineral oil

Corresponding author: Iuliia P. Baikova. E-mail: baykjulia@gmail.com

For citation: Safonova N.I., Dolmatova D.M., Fadeev V.S., Aliper G.M., Silaeva Yu.U., Baikova Iu.P. Optimization of sample preparation protocol for histological analysis of *Danio rerio* tissues using isopropanol and mineral oil. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):83–94 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 25-14-00373.

Received 02.06.2026. **Received in revised form** 11.06.2026. **Accepted** 22.06.2026.

Введение

Приготовление гистологических препаратов включает в себя следующие последовательные этапы: вырезка, фиксация, декальцинация (при необходимости), проводка, заливка, микротомия, окрашивание.

Фиксация – это процесс, направленный на предотвращение аутолиза и сохранение прижизненной структуры исследуемых образцов. Фиксация и выбор фиксирующего средства могут оказать существенное влияние на последующие этапы пробоподготовки, поскольку каждый фиксатор вносит характерные артефакты в образцы тканей, сказывается на сохранности и окрашиваемости клеточных компонентов [1]. Наиболее часто используемыми фиксаторами для *Danio rerio* являются 10% нейтральный забуференный формалин (neutral buffered formalin, NBF) или свежеприготовленный незабуференный 4% параформальдегид (paraformaldehyde, PFA) [1–5], фиксаторы Дитриха и Дэвидсона [3, 6] и фиксатор Буэна [3, 7–9].

При наличии в исследуемых образцах костных структур из них необходимо удалить соли кальция. Этот процесс осуществляется с помощью химических агентов – 5–10% растворов органических или неорганических кислот, образующих растворимые соли кальция, или хелатирующих агентов, которые связываются с ионами кальция [1, 10, 11]. На следующем этапе из образцов удаляются вода и остатки фиксатора. Так как вода в тканях встречается в двух формах, свободной и связанной, необходимо применять правильные схемы дегидратации тканей, которые будут удалять только свободную воду. Удаление связанной воды может приводить к появлению артефактов, вызывать сухость и хрупкость тканей, что препятствует нормальной микротомии [1]. Стандартным агентом для дегидратации при гистологической проводке является этиловый или изопропиловый спирт (ИПС) [12–15].

После полной дегидратации для последующего пропитывания парафином необходим этап просветления. Просветляющие агенты полностью замещают в ткани спирты, обеспечивая лучшую смешиваемость образцов с расплавленным парафином. Традиционно для этой цели используется ксилол, однако ввиду высокой токсичности в современных методиках его часто заменяют менее вредными веществами, например минеральным маслом [12–16]. Рекомендуемый протокол просветления с его применением включает последовательную обработку образца сначала промежуточной смесью изопропанола и минерального масла в соотношении 5:1, затем смесью в соотношении 2:1 с последующей финальной выдержкой в чистом минеральном масле [12].

Далее ткань пропитывают расплавленным гистологическим парафином так, чтобы парафин полностью вытеснил просветляющий агент и заполнил межклеточные пространства. После завершения инфильтрации формируется парафиновый блок – образец ориентируют в металлической (или иной) заливочной форме, заливают парафином, затем устанавливают кассету как основание блока и быстро охлаждают на холодной плите до полного затвердевания. После его можно закрепить в микротоме и получить серийные срезы для окрашивания и дополнительных исследований [17, 18].

Значительное разнообразие используемых в гистологической практике техник, реактивов и протоколов требует от исследователя тщательного подбора мето-

дики. Основной задачей нашего исследования было создание методологических гистологических протоколов, оптимальных для такого объекта как взрослые особи *Danio rerio*, применимых для ручной проводки образцов, не требующих узкоспециализированного лабораторного оборудования и максимально безопасных для оператора. С этой целью после анализа литературы были выбраны, отработаны, модифицированы и проанализированы наиболее часто используемые в мировой практике протоколы.

Материалы и методы

Формирование экспериментальных групп. В качестве объекта исследования были выбраны взрослые самцы и самки (до нереста и после него) *Danio rerio* дикого типа возраста 7 месяцев. Группы для эксперимента включали в себя самцов (общее количество 50 штук) и самок (общее количество 50 штук, из них 40 до нереста и 10 после него). Все этапы исследования соответствуют законодательству Российской Федерации и нормативным документам, а также одобрены локальным этическим комитетом Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (протокол № 2 от 26.12.2025).

Условия содержания и оснащение. Комплексная система содержания рыб и выращивания мальков Aquaneering (Aquaneering, США) с автономной и централизованной фильтрацией Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Температура воды 26°C, pH 7,5, dH 10° (все параметры контролируются динамически). Объем емкостей для содержания рыб составлял 5 литров для индивидуального содержания и 20 литров для групп до 15 особей, с частичной подменой воды, 10% ежедневно. Кормление осуществлялось через час после включения света. Кормление двухдневными науплиями рачков *Artemia salina*, выращенными из цист. Свет от 600 до 1100 лк, освещение по таймеру 12/12.

Выведение из эксперимента проводилось с использованием трикаин метансульфоната (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 800 мг/л с последующим помещением рыбы в ледяную воду до полного прекращения сердцебиения.

После выведения из эксперимента особь фиксировали на столе при помощи игл для фиксации за хвост и нижнюю челюсть. Делали разрез кожи и мышц вдоль брюшка от анального отверстия до оперкулума и удаляли боковую стенку. На следующем этапе удаляли часть стенки плавательного пузыря. Далее удаляли хвостовую часть, проводя разрез непосредственно за анальным отверстием, и отделяли голову [11]. Необходимость отделения головы была обусловлена рекомендуемым для используемого оборудования размером парафинового блока 20×20 мм для получения среза оптимального качества. У половины особей были сепарированы головной мозг, органы брюшной полости и позвоночный столб.

После препарирования были получены следующие варианты образцов для дальнейшего исследования (один образец – один блок).

1. Голова до заднего края жаберных крышек.
2. Сепарированный головной мозг.
3. Туловище с одной боковой стенкой.
4. Комплекс органов брюшной полости.
5. Очищенный от мягких тканей позвоночный столб.

Используемое оборудование: термостат Binder BD023-230V (Binder, Германия), микротом ротационный полуавтоматический RMD-3000 («МедТехникаПоинт», Россия), слайдбаня-30/60 (КБ «Техном», Россия), нагревательный столик «Микростат 30/80» (КБ «Техном», Россия), микроскоп Nikon Eclipse-Ti (Nikon, Япония).

Используемые реактивы: PFA (Acros Organics, Бельгия), 10% NBF («Медикс», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, «Ареолаб», Россия), ледяная уксусная кислота (PanReac AppliChem, Испания), фиксатор Буэна (LTB, Россия), изопропиловый спирт «Дегидратант» («Медикс», Россия), трихлоруксусная кислота («ЛенРеактив», Россия), азотная кислота (Уральский завод химических реактивов, Россия), алюмокалиевые квасцы («ЛенРеактив», Россия), промежуточная среда № 1 («Медикс», Россия), промежуточная среда № 2 («Медикс», Россия), минеральное масло («Медикс», Россия), универсальная парафиновая заливочная среда («Медикс», Россия), депарафинирующий раствор («Медикс», Россия), ксилол («Медикс», Россия), набор для окрашивания гематоксилином регрессивным и эозином спиртовым («Медикс», Россия), среда для заключения (Diapath, Италия).

С каждого полученного блока было получено от 5 до 10 стекол (в зависимости от размера образца), по 3–4 среза толщиной 5 мкм на стекло с подрезкой в 50 микрон между срезами. Для получения микрофотографий использовали режим сшивки для захвата всех полей зрения и/или выбирали центральное по отношению к срезу поле зрения.

Статистическая обработка дизайном эксперимента не предполагалась.

Результаты

Для образцов, содержащих костную ткань, на основе анализа данных литературы составлено 64 варианта протоколов, различающихся фиксирующими растворами, декальцинирующими агентами и временем проводки. На первом этапе было решено определить необходимое время выдержки в спиртах для дегидратации и достаточное время декальцинации в ЭДТА, что позволило бы значительно уменьшить число необходимых экспериментов (табл. 1).

Исходя из данных литературы, спиртосодержащие фиксаторы могут требовать уменьшения времени дегидратации, а фиксаторы на основе пикриновой кислоты его увеличения [19]. На основании полученных нами ранее данных с использованием различных модельных объектов (мыши, кролики, крысы) и источников

Таблица 1 | Table 1

Схема предварительного эксперимента для образцов, содержащих костную ткань | Experimental design for samples containing bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
Голова целиком – 32 штуки (16 ♂, 16 ♀ до нереста) | Whole head – 32 samples (16 ♂, 16 ♀ before spawning) Туловище с боковой стенкой – 32 штуки (16 ♂, 16 ♀ до нереста) | Trunk with body wall – 32 samples (16 ♂, 16 ♀ before spawning) Позвоночный столб – 16 штук (16 ♂) | Spine – 16 samples (16 ♂) Итого: 2 образца головы, 1 образец позвоночного столба, 2 образца туловища с боковой стенкой на протокол | Total (per protocol): two whole-head specimens, one spine specimen, two trunks with body wall	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	0,5М ЭДТА pH 8,0 ● 1 сутки ● 3 суток ● 5 суток ● 7 суток с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) ● 1 day ● 3 days ● 5 days ● 7 days, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100%: ● по 20 минут ● по 30 минут ● по 40 минут ● по 60 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for: ● 20 min ● 30 min ● 40 min ● 60 min 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительные фиксация, отмывание и декальцинация (независимо от времени декальцинации); недостаточная дегидратация при выдержке при 20 и 30 минутах (невозможно получить срез); пересыхание мышечной ткани при дегидратации в 60 минут | Satisfactory fixation, rinsing, and decalcification (irrespective of decalcification time); insufficient dehydration with 20 and 30 min exposition (sectioning was not possible); excessive drying of muscle tissue during 60-minute dehydration

литературы [1, 3, 6, 9] мы полагаем, что ключевыми параметрами для времени дегидратации являются толщина, размер образца, плотность и тип ткани. Для предварительного эксперимента были выбраны наиболее распространенный фиксатор 10% NBF, время фиксации в котором составляет 24 часа и не требует подбора, и бескислотный декальцинатор как более подходящий для оценки морфологии благодаря действию при pH 8,0. Согласно данным литературы, время декальцинации в бескислотном декальцинаторе во многом зависит от размера и плотности образца. С учетом того, что строение костей *Danio rerio* схоже с таковым у млекопитающих [20], нами был выбран временно́й интервал декальцинации от 1 до 7 суток с ежедневной сменой декальцинирующей жидкости и механической проверкой степени декальцинации. Таким образом, предварительное исследование включало в себя как подбор времени декальцинации для бескислотного декальцинатора, так и оценку дегидратации на основе протокола, обеспечивающего удовлетворительную декальцинацию. На данном этапе были использованы образцы самцов *Danio rerio* и самок до нереста (самки до нереста были выделены в отдельную группу, поскольку большое содержание белков, липидов и воды в икре, а также более крупный размер рыбы могли повлиять на время дегидратации). Физические параметры самок после нереста практически не отличались от таковых у самцов.

Обнаружено, что оптимальное время выдержки в растворах ИПС в ходе эксперимента составляет 40 минут. Также определено, что 24 часа декальцинации в 0.5М ЭДТА pH 8,0 достаточно для удаления солей кальция (приведенные параметры совпадают с данными ряда исследователей) [1, 3]. Итоговая схема эксперимента содержала семь вариантов протоколов, включая опубликованные ранее протоколы [5, 7, 11] для фиксаторов Дитриха и Буэна с последующей декальцинацией с использованием 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (табл. 2). С парафиновых блоков, полученных по данным протоколам, делали срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином регрессивным и эозином спиртовым согласно протоколу фирмы-производителя.

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что наиболее простым является протокол на основе 10% NBF и 0.5М ЭДТА pH 8,0 (рис. 3, 4). Следует отметить, что протокол с использованием фиксатора Буэна показал идентичные по качеству результаты, однако использование данного фиксатора делает невозможным иммуногистохимическое исследование и требует больших затрат изопропанола на этапе отмывания.

Таблица 2 | Table 2

Варианты протоколов для образцов *Danio rerio*, содержащих костную ткань | Protocols for *Danio rerio* samples containing bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
Голова целиком – 21 штука (14 ♂, 7 ♀) | Whole head – 21 samples (14 ♂, 7 ♀) Туловище с боковой стенкой – 14 штук (7 ♂, 7 ♀ до нереста) | Trunk with body wall – 14 samples (7 ♂, 7 ♀ before spawning) Позвоночный столб – 7 штук (7♂) | Spine – 7 samples (7 ♂)	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	0.5M ЭДТА pH 8,0 – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно | Satisfactory
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h			
Итого: 3 образца головы, 1 образец позвоночного столба, 2 образца туловища с боковой стенкой на протокол | Total (per protocol): three whole-head specimens, one spine, two trunks with body wall	Фиксатор Дитриха – 1 сутки | Dietrich's fixative – 24 h	5% ТХУ – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах по 30 минут в 70% ИПС | 5% TCAA – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Выявленные артефакты: слабые деформационные изменения тканей брюшной полости, слабое окрашивание, вызванное, вероятно, ТХУ (рис. 1) | Artefacts – subtle distortions of the abdominal cavity, weak staining probably due to TCAA (Fig. 1)
	Фиксатор Дэвидсона – 1 сутки | Davidson's fixative – 24 h			
	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	5% раствор азотной кислоты – 1 сутки. Нейтрализация кислоты и стабилизация тканей в 5% растворе алюмокалиевых квасцов ($KAl(SO_4)_2$) с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 5% nitric acid – 24 h. Acid neutralization and tissue stabilization in 5% potassium alum solution ($KAl(SO_4)_2$) followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Выявленные артефакты: нарушение морфологии мягких тканей (рис. 2) | Artefacts – disturbed soft tissue morphology (Fig. 2)
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h			

Окончание таблицы 2 | End table 2

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
	Фиксатор Буэна – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Bouin fixative – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each	0.5М ЭДТА pH 8,0 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно | Satisfactory

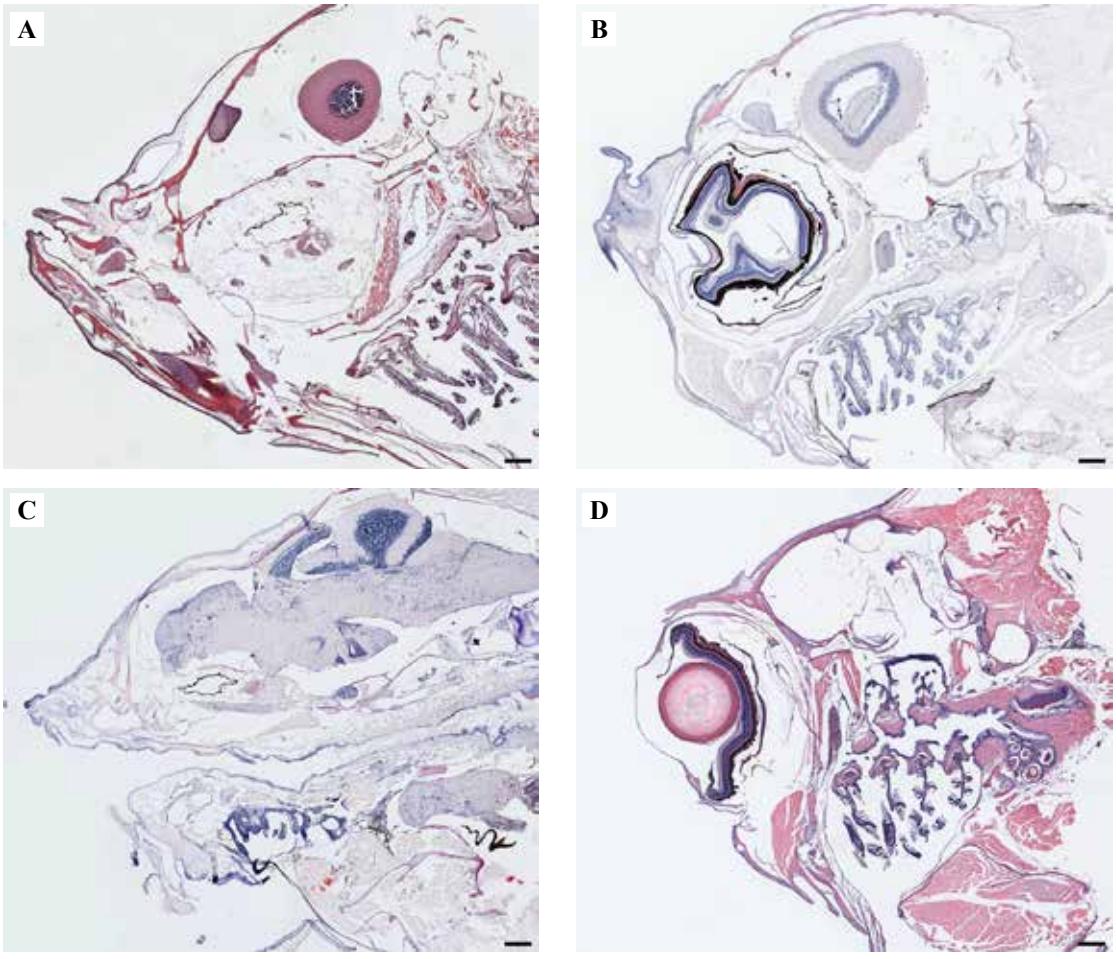


Рис. 1. Фронтальные срезы головы *Danio rerio.*
A – после фиксации 10% NBF и декальцинации в 5% HNO_3. B – после фиксации раствором Дитриха и декальцинации в 5% ТХУ. C – после фиксации раствором Дэвидсона и декальцинации в 5% ТХУ. D – после фиксации раствором Буэна и декальцинации в ЭДТА 0.5М pH 8,0. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 300 мкм

Fig. 1. Frontal *Danio rerio* head samples.
A – after fixation with 10% NBF and decalcification with 5% HNO_3. B – after fixation with Dietrich's fixative and decalcification with 5% TCAA. C – after fixation with Davidson's fixative and decalcification with 5% TCAA. D – after fixation with Bouin fixative and decalcification with 0.5M EDTA (pH 8.0). H&E stain. Scale bar 300 μm

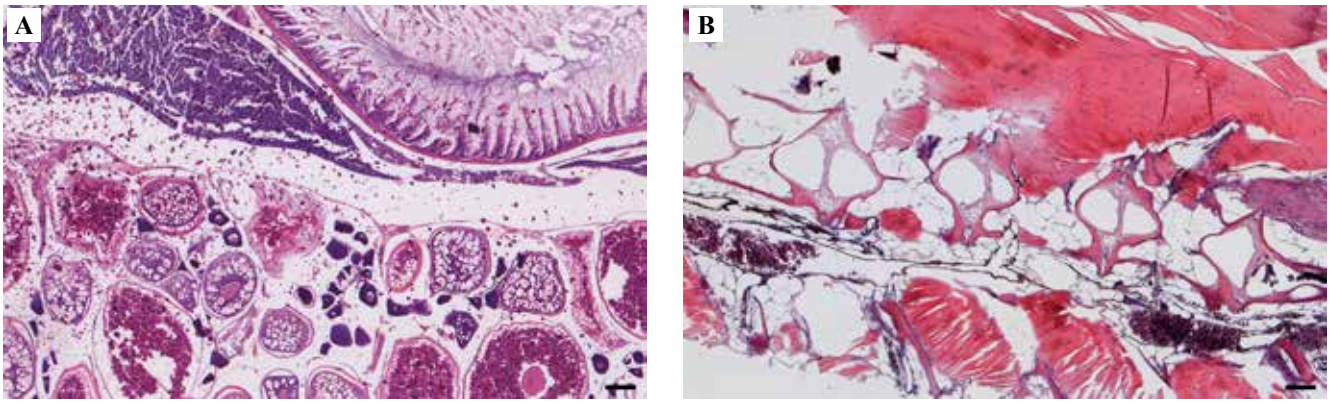


Рис. 2. Прочие артефакты, вызванные декальцинацией 5% HNO_3.
А – сагиттальный срез органов брюшной полости самки *Danio rerio*. В – сагиттальный срез в области позвоночника *Danio rerio*. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм

Fig. 2. Other artefacts caused by 5% HNO_3 decalcification.
A – *Danio rerio* female internal organs sagittal section. B – *Danio rerio* spine sagittal section. H&E stain. Scale bar 100 μm

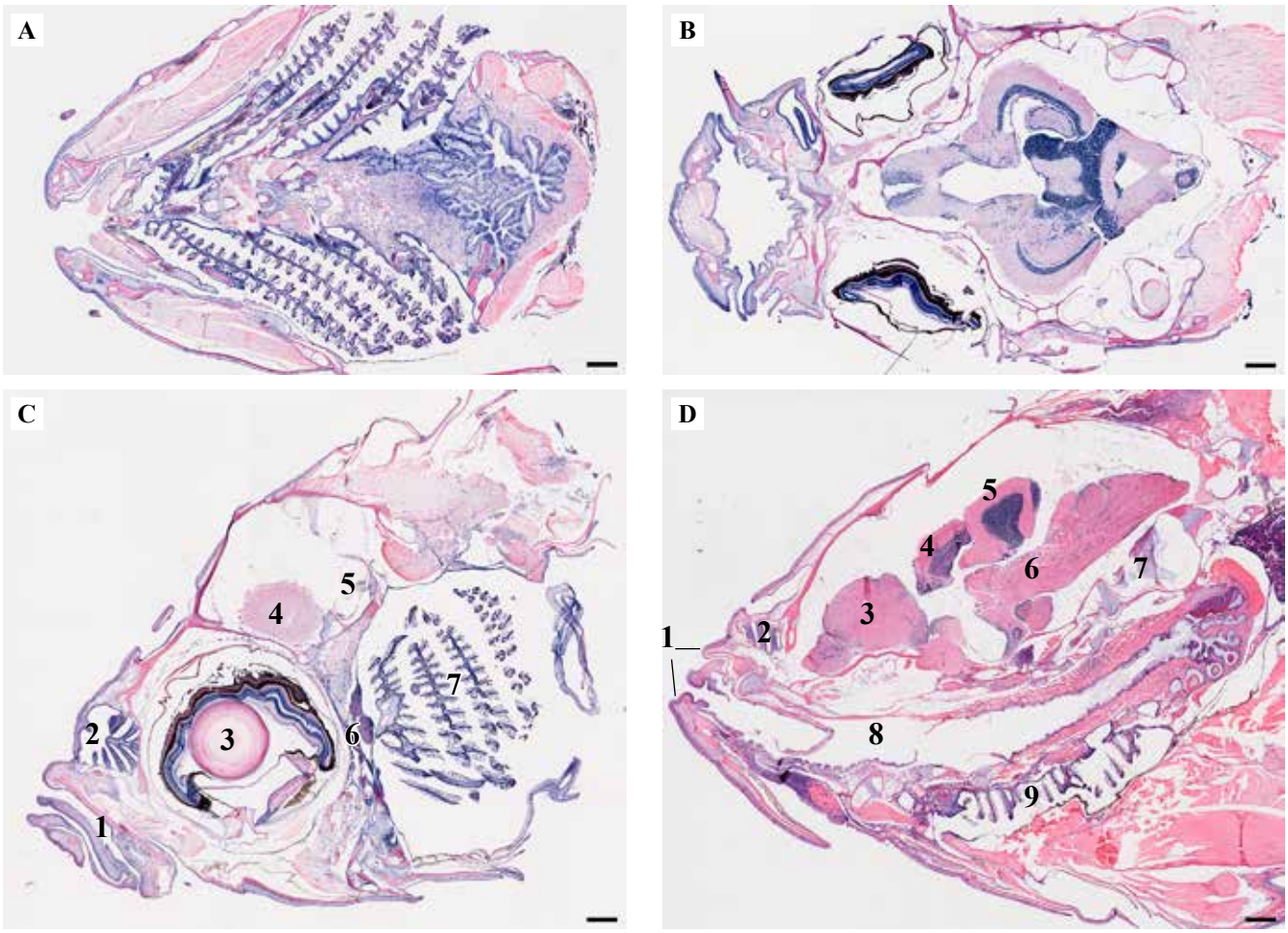


Рис. 3. Фронтальный и сагиттальный срезы головы *Danio rerio*.
А, В – фронтальные срезы головы *Danio rerio*. С, D – сагиттальные срезы головы *Danio rerio*. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 300 мкм
С: 1 – ротовая полость, 2 – обонятельная сумка, 3 – глаз, 4 – мозг, 5 – внутреннее ухо, 6 – псевдожабра, 7 – жабры
D: 1 – губы, 2 – обонятельная сумка, 3 – конечный мозг, 4 – средний мозг, 5 – мозжечок, 6 – промежуточный мозг, 7 – внутреннее ухо, 8 – пищевод, 9 – жабры

Fig. 3. Frontal and sagittal *Danio rerio* head sections.
A, B – frontal. C, D – sagittal. H&E stain. Scale bar 300 μm.
C: 1 – oral cavity, 2 – olfactory organ, 3 – eye, 4 – brain, 5 – inner ear, 6 – pseudobranchia, 7 – gills
D: 1 – lips, 2 – olfactory organ, 3 – telencephalon, 4 – mesencephalon, 5 – cerebellum, 6 – diencephalon, 7 – inner ear, 8 – esophagus, 9 – gills

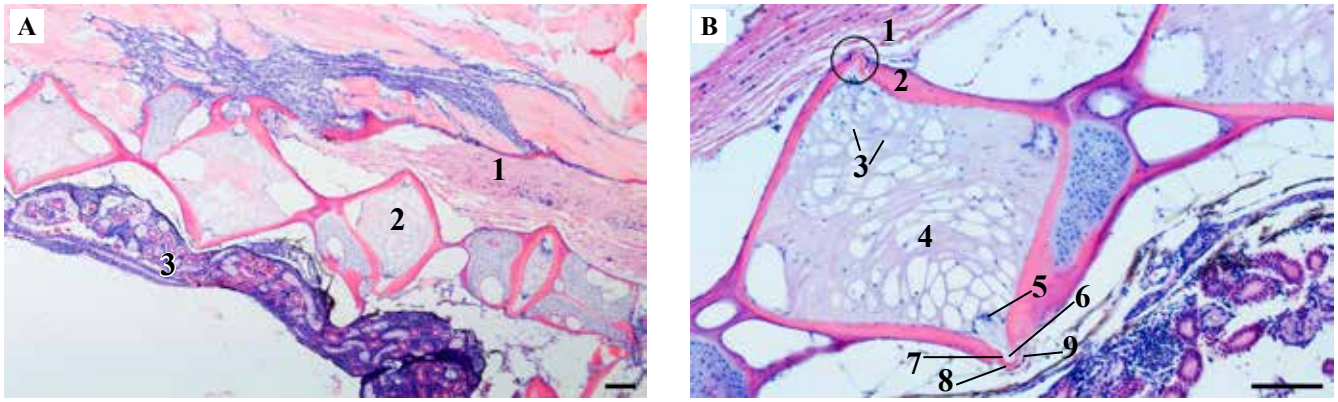


Рис. 4. Сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio.*
А – сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio*, ×4. В – сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio*, ×10. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм
А: 1 – спинной мозг, 2 – позвоночник, 3 – почка
В: 1 – межпозвоночное соединение, 2 – костный матрикс, 3 – вакуолизированные клетки нотохорды, 4 – нотохорда, 5 – базальные клетки нотохорды, 6 – оболочка нотохорды, 7 – наружная эластическая мембрана, 8 – наружная связка, 9 – соединительная ткань наружной связки

Fig. 4. *Danio rerio* spine sagittal section.
A – *Danio rerio* spine sagittal section, ×4. B – *Danio rerio* spine sagittal section, ×10. H&E stain. Scale bar 100 μm.
A: 1 – spinal cord, 2 – spine, 3 – kidney
B: 1 – intercentral joint, 2 – bone matrix, 3 – notochord vacuolated cells, 4 – notochord, 5 – notochord basal cells, 6 – notochord sheath, 7 – elastic externa, 8 – external ligament, 9 – external ligament connective tissue

Для образцов, не содержащих костную ткань, на основе данных литературы составлено 20 протоколов, отличающихся фиксирующими агентами и временем выдержки в спиртах на этапе дегидратации. Как и в случае с образцами, содержащими костную ткань, было решено сначала определить необходимое время выдержки в спиртах (табл. 3). Для данного этапа использовали образцы сепарированного головного мозга и комплекса органов брюшной полости самцов, оставшиеся от предыдущих этапов исследования, а также образцы самок до нереста.

Определено, что достаточное время выдержки в спиртах составляет 30 минут. Итоговая схема эксперимента включала в себя пять вариантов протоколов (табл. 4).

Таблица 3 | Table 3

Схема предварительного эксперимента для образцов, не содержащих костную ткань | Experimental design for samples without bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Проводка | Processing	Результат | Result
Сепарированный головной мозг – 16 штук (16 ♂) | Dissected brain – 16 samples (16 ♂) Комплекс органов брюшной полости – 24 штуки (16 ♂, 8 ♀) | Abdominal organs – 24 samples (16 ♂, 8 ♀) Итого: по 4 сепарированных мозга, 4 комплекса органов брюшной полости ♂, 2 комплекса органов брюшной полости ♀ до нереста на протокол | Total (per protocol): four dissected brains, four abdominal organ complexes ♂, two abdominal organ complexes ♀ before spawning	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100%: • по 20 минут • по 30 минут • по 40 минут • по 60 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for: • 20 min • 30 min • 40 min • 60 min 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительные фиксация и отмывание. Недостаточная дегидратация при выдержке 20 минут. Пересушивание образцов при выдержке более 30 минут | Satisfactory fixation and rinsing. Insufficient dehydration with a 20-minute exposure. Excessive drying when exposed to IPA longer than 30 min

Таблица 4 | Table 4

Варианты протоколов для образцов *Danio rerio*, не содержащих костную ткань | Protocols for *Danio rerio* samples without bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Проводка | Processing	Результат | Result
Сепарированный головной мозг – 30 штук (4 ♂, 16 ♀ до нереста, 10 ♀ после нереста) | Dissected brain – 30 samples (4 ♂, 16 ♀ before spawning, 10 ♀ after spawning) Комплекс органов брюшной полости – 29 штук (10 ♂, 9 ♀ до нереста, 10 ♀ после нереста) | Abdominal organs – 29 samples (10 ♂, 9 ♀ before spawning, 10 ♀ after spawning) Итого: по 6 образцов сепарированного мозга, 2 комплекса органов брюшной полости ♂, 2 комплекса органов брюшной полости ♀ до нереста (за исключением протокола с 10% NBF, где был 1 образец), по 2 комплекса органов брюшной полости ♀ после нереста на протокол | Total (per protocol): six dissected brains, two abdominal organ complexes ♂, two abdominal organ complexes ♀ before spawning (excluding the protocol with 10% NBF, for which a single sample was used), two abdominal organ complexes ♀ after spawning	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 30 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 30 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно для всех образцов | Satisfactory for all samples
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h		
	Фиксатор Дитриха – 1 сутки | Dietrich's fixative – 24 h	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 30 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 30 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно для всех образцов. Обработка с использованием фиксатора Дэвидсона дает более качественный срез и контрастное окрашивание в случае комплексов органов брюшной полости самок до нереста | Satisfactory for all samples; Davidson's fixative provided better-quality sections and more pronounced staining of abdominal organ complexes from pre-spawning females
	Фиксатор Дэвидсона – 8 часов с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Davidson's fixative – 8 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each		
	Фиксатор Буэна – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Bouin fixative – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each		

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что наиболее простыми являются протоколы на основе 10% NBF и фиксатора Буэна для самцов и самок после нереста и на основе фиксатора Дэвидсона для самок с икрой (рис. 5, 6). Фиксатор Дэвидсона, по-видимому, препятствует расслоению содержимого зрелых ооцитов, что положительно сказывается на качестве окрашенных гематоксилином и эозином срезов. Для рутинной работы целесообразнее использовать протокол на основе 10% NBF, так как он позволяет сократить объем используемого ИПС, необходимого для фиксаторов Дэвидсона и Буэна на этапе отмывания после фиксатора.

По неопубликованным нами к настоящему моменту данным, изопропанол и минеральное масло могут быть использованы в том числе для проводки объектов малых размеров (с учетом сокращения времени выдержки в спиртах до 10 минут), таких как мальки *Danio rerio* в возрасте от 1 недели до 1 месяца, эмбрионы мыши со стадии e8.5 (фиксация 10% NBF), глазные яблоки

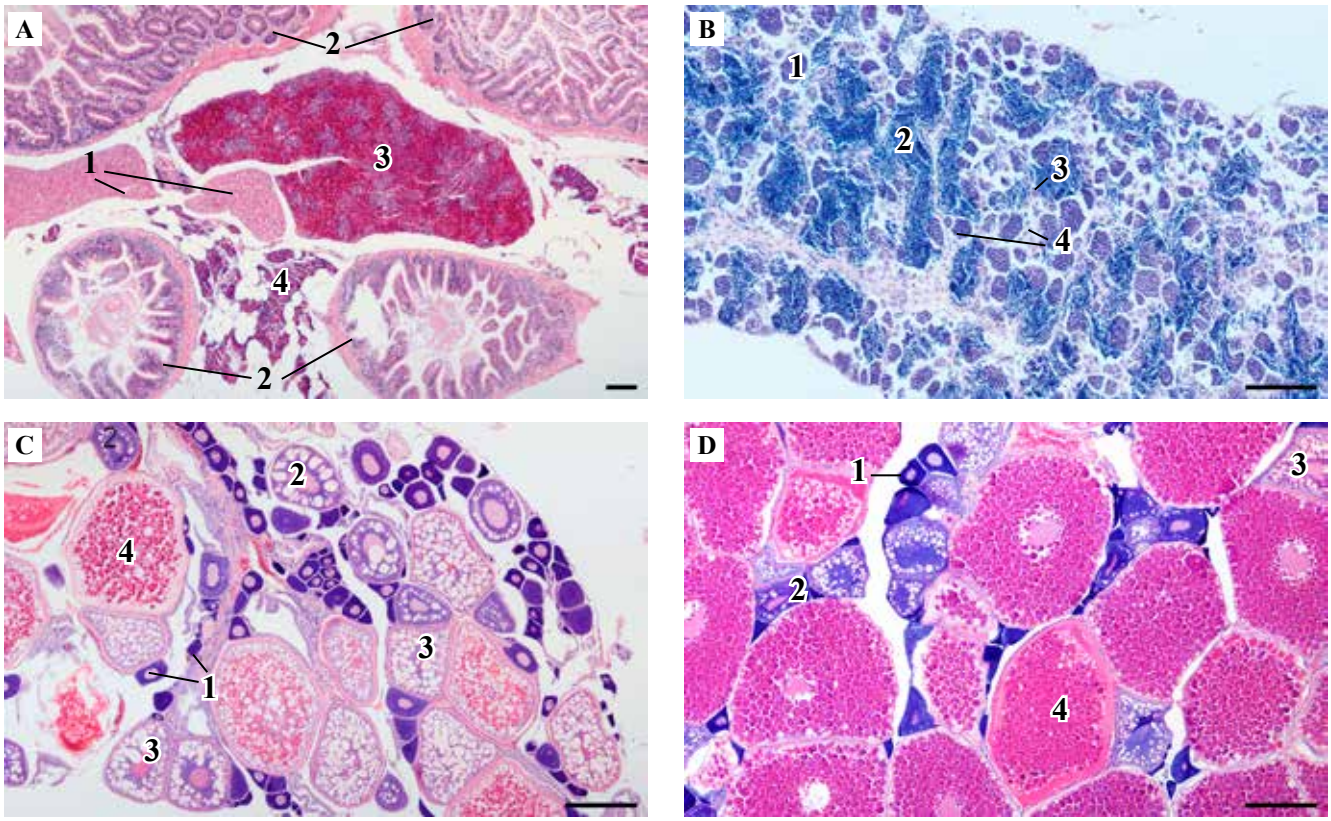


Рис. 5. Сагиттальный срез органов брюшной полости *Danio rerio.*
А – органы брюшной полости самца, ×4. B – гонады самца, ×10. C – гонады самки после нереста, ×10. D – гонады самки до нереста, ×10. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм
A: 1 – печень, 2 – кишечник, 3 – селезенка, 4 – поджелудочная железа
B: 1 – сперматоциты, 2 – сперматозоиды, 3 – сперматогонии, 4 – базальная мембрана и соединительнотканный листок
C: 1 – ооцит первого порядка, 2 – стадия кортикальных альвеол, 3 – стадия вителлогенеза, 4 – зрелый ооцит
D: 1 – ооцит первого порядка, 2 – стадия кортикальных альвеол, 3 – стадия вителлогенеза, 4 – зрелый ооцит

Fig. 5. *Danio rerio* internal organs sagittal section.
A – male internal organs, ×4. B – male gonads, ×10. C – female gonads after spawning, ×10. D – female gonads before spawning, ×10. H&E stain. Scale bar 100 μm
A: 1 – liver, 2 – intestines, 3 – spleen, 4 – pancreas
B: 1 – spermatocytes, 2 – spermatozoa, 3 – spermatogonia, 4 – basement membrane and connective tissue layer
C: 1 – primary oocyte, 2 – cortical alveoli stage, 3 – vitellogenesis, 4 – mature oocyte
D: 1 – primary oocyte, 2 – cortical alveoli stage, 3 – vitellogenesis, 4 – mature oocyte

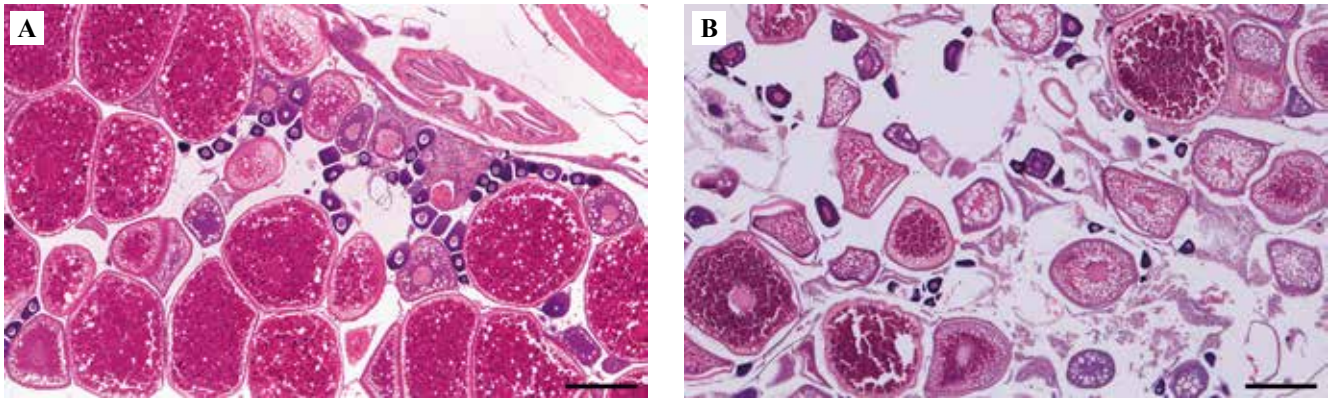


Рис. 6. Сагиттальный срез органов брюшной полости *Danio rerio*.
А – гонады самки до нереста после фиксации 10% NBF. B – гонады самки до нереста после фиксации раствором Буэна. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм

Fig. 6. *Danio rerio* sagittal section of internal organs.
A – female gonads before spawning after fixation with 10% NBF. B – female gonads after fixation with Bouin fixative. H&E stain. Scale bar 100 μm

новорожденных мышат (предпочтительная фиксация раствором Дэвидсона). Эти протоколы были опробованы нами и используются в рутинных исследованиях на таких малых объектах как яичники [21] и фрагменты диафрагмы мышей [22]. При работе с крупными объектами, такими как мозг взрослой мыши и эмбрионы мыши со стадии e15.5, личинки от 8 см длиной и поперечные срезы взрослой особи миноги *Lampetra fluviatilis*, также получены удовлетворительные результаты (данные готовятся к публикации). В этом случае экспериментально определенное время выдержки в спиртах составляет от 30 до 40 минут. Мы предполагаем, что полученные нами протоколы могут являться универсальными и требовать незначительных изменений на этапе дегидратации при работе с широким спектром биологических объектов.

Заключение

Таким образом, оптимальным фиксатором для любых образцов *Danio rerio* является 10% нейтральный забуференный формалин, однако в случае исследования брюшной полости половозрелых самок до нереста лучше использовать фиксатор Дэвидсона, препятствующий расслоению ооплазмы зрелых ооцитов и дающий впоследствии более яркое окрашивание гематоксилином и эозином. Если образцы содержат костную ткань, предпочтительна суточная хелатная декальцинация с использованием 0.5М этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0. Время выдержки в спиртах варьирует от 30 минут для мягких тканей до 40 минут для образцов, содержащих костную ткань, но следует учитывать, что это актуально для взрослых особей *Danio rerio* (7 месяцев, 3–3,5 см). Время выдержки должно быть изменено и подобрано экспериментально в зависимости от размера особи. В целом, гистологическая проводка с использованием изопропанола и минерального масла показала хорошие результаты и может быть признана эффективной и безопасной альтернативой классической проводке через этанол и ксилол в гистологии рыб.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – Ю.П. Байкова, Ю.Ю. Силаева.
Поддержание системы содержания рыб Aquaneering и сбор материала – Д.М. Долматова, В.С. Фадеев, Г.М. Алипер.
Обработка материала – Н.И. Сафонова, Ю.П. Байкова.
Написание текста – Ю.П. Байкова.
Редактирование – Ю.П. Байкова, Ю.Ю. Силаева, В.С. Фадеев.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – Iu.P. Baikova, Yu.U. Silaeva.
Maintaining the aquatic culture system Aquaneering and material collection – D.M. Dolmatova, V.S. Fadeev, G.M. Aliper.
Collected the data and performed the analysis – N.I. Safonova, Iu.P. Baikova.
Wrote the paper – Iu.P. Baikova.
Edited the manuscript – Iu.P. Baikova, Yu.U. Silaeva, V.S. Fadeev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Благодарности. Работа по получению гистологических срезов проводилась с использованием приборной базы Института биологии гена РАН, поддержанной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Acknowledgments. Histological sections were prepared using facilities and specialized equipment of the Institute of Gene Biology RAS, supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Литература/References

1. *Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD*. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed. London: Elsevier, 2019. 557 p. DOI: 10.1016/C2015-0-00143-5.
2. *Ulucan A, Yuksel H, Dortbudak MB, Yakut S.* Comparative examination of commonly used some fixatives with routine histochemical staining's for the optimal histological appearance in the gill tissue of zebrafish. Kocatepe Vet J. 2019;12(2):158–67. DOI: 10.30607/kvj.526779.
3. *Amatruda JF, Houart C, Kawakami K, Poss KD.* Zebrafish. Methods and protocols. 3rd ed. New York: Humana, 2024. 361 p. DOI: 10.1007/978-1-0716-3401-1.
4. *Peterson TS, Kent ML, Ferguson JA, Watral VG, Whipps CM.* Comparison of fixatives and fixation time for PCR detection of *Mycobacterium* in zebrafish *Danio rerio.* Dis Aquat Organ. 2013;104(2):113–20. DOI: 10.3354/dao02585.
5. *Moore JL, Aros M, Steudel KG, Cheng KC.* Fixation and decalcification of adult zebrafish for histological, immunocytochemical, and genotypic analysis. Biotechniques. 2002;32(2):296–8. DOI: 10.2144/02322st03.
6. Zebrafish International Resource Center. Fixing zebrafish for histopathology. SOP: Vet-0003, Rev: 1.0 [Internet]. Eugene (OR): Zebrafish International Resource Center; 2009 Jul 13. Available from: https://zebrafish.org/wiki/_media/protocols/health/fixing_zebrafish_for_histopathology.pdf (accessed 28.05.2026).
7. *Evensen Ø, Olesen NJ.* Immunohistochemical detection of VHS virus in paraffin-embedded specimens of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the influence of primary antibody, fixative, and antigen unmasking on method sensitivity. Vet Pathol. 1997;34(3):253–61. DOI: 10.1177/030098589703400316.
8. *Bunton TE.* The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues. Vet Pathol. 1993;30(5):418–25. DOI: 10.1177/030098589303000503.
9. *Miki M, Ohishi N, Nakamura E, Furumi A, Mizuhashi F.* Improved fixation of the whole bodies of fish by a double-fixation method with formalin solution and Bouin's fluid or Davidson's fluid. J Toxicol Pathol. 2018;31(3):201–6. DOI: 10.1293/tox.2018-0001.
10. *Dey P.* Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. 2nd ed. Singapore: Springer Singapore, 2022. 340 p. DOI: 10.1007/978-981-19-6616-3.
11. *Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, van Rossum DB, Vanselow DJ, Hubley MJ et al.* Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2018;208:38–46. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.11.003.

12. *Buesa RJ, Peshkov MV.* Histology without xylene. Ann Diagn Pathol. 2009;13(4):246–56. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005.
13. *Devendrababu YV, Vikram V, Anandbabu T.* Safer and sustainable alternatives to xylene in histopathology: a comprehensive review. J Appl Toxicol. 2026;46(3):775–92. DOI: 10.1002/jat.70029.
14. *Yadav S, Mallya V, Khurana N*. Xylene-free staining: is it possible and practical? Indian J Pathol Microbiol. 2019;62(2):274–8. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_39_18.
15. *Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Möller E.* Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. Lab Invest. 2001;81(9):1213–21. DOI: 10.1038/labinvest.3780335.
16. *Darsheny S, Nway Aye S, Krishnappa P, Ravindran R*. Comparative study of microwave oven-assisted tissue processing with isopropanol and mineral oil mixture and propylene glycol methyl ether on morphological quality of tissue sections. IMJM. 2021;20(4):53–7. DOI: 10.31436/imjm.v20i4.1724.
17. CELLINK. Paraffin embedding protocol: version 3 [Internet]. Gothenburg (Sweden): CELLINK; 2023 Mar 28. Available from: https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2023/03/Paraffin-Embedding-Protocol_28-Mar-2023.pdf (accessed 28.05.2026).
18. Electron Microscopy Sciences. EMS Rapid Pro Processing System. Protocol: paraffin manual processing for fresh and pre-treated tissue: instructional manual, Cat. #26750 Series [Internet]. Hatfield (PA): Electron Microscopy Sciences. Available from: https://www.emsdiasum.com/docs/technical/manuals/26750-paraffin.pdf (accessed 28.05.2026).
19. *Malatesta M.* Histological and histochemical methods – theory and practice. Eur J Histochem [Internet]. 2016;60(1). DOI: 10.4081/ejh.2016.2639.
20. *Chang Z, Chen PY, Chuang YJ, Akhtar R.* Zebrafish as a model to study bone maturation: nanoscale structural and mechanical characterization of age-related changes in the zebrafish vertebral column. J Mech Behav Biomed Mater. 2018;84:54–63. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.05.004.
21. *Kuznetsova NA, Kochegarova KK, Baikova IP, Korshunov EN, Ilchuk LA, Kubekina MV et al.* Ubiquitous expression of *mPolg*^{mut} leads to the accumulation of cytotoxic CD8+ T lymphocytes in young mice. Life. 2025;15(12):1863. DOI: 10.3390/life15121863.
22. *Baikova IP, Ilchuk LA, Safonova PD, Varlamova EA, Okulova YD, Kubekina MV et al.* Two novel mouse models of Duchenne muscular dystrophy with similar Dmd exon 51 frameshift mutations and varied phenotype severity. Int J Mol Sci. 2024;26(1):158. DOI: 10.3390/ijms26010158.

Информация об авторах

Наталья Ибрагимовна Сафонова – гистотехник Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Дарья Михайловна Долматова – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Виталий Сергеевич Фадеев – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Глеб Миронович Алипер – старший лаборант лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Юлия Юрьевна Силаева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Юлия Павловна Байкова – кандидат биологических наук, научный сотрудник, гистолог Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Author information

Natalia I. Safonova – Histotechnician, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0009-0004-5992-3878

Daria M. Dolmatova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0000-0002-8396-2672

Vitaliy S. Fadeev – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0009-0007-0909-0427

Gleb M. Aliper – Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0009-0003-2711-4737

Yulia Yu. Silaeva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0000-0003-2070-9001

Iuliia P. Baikova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Histologist, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0000-0002-1901-3640