

ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБРАТНО-РАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА, ВЫНУЖДЕННО УДАЛЕННОГО У ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Шабалдин А.В.¹, Мухамадияров Р.А.¹, Кошелев В.А.¹,
Ведерникова А.В.², Ровда Ю.И.², Гришачева Е.О.¹, Халивопуло И.К.¹,
Миняйлова Н.Н.², Ляпин А.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Резюме. Тимэктомия в ряде клинических ситуаций является вынужденным этапом кардиохирургического лечения врожденных пороков сердца, но вопрос о ее влиянии на формирование иммунитета в раннем онтогенезе остается открытым. До сих пор среди ученых ведутся споры о развитии иммунодефицитных состояний у детей, перенесших тимэктомию в раннем возрасте. Как в зарубежной, так и отечественной литературе можно видеть совершенно разнополярные мнения. Одним из направлений в решении этого вопроса может быть морфофункциональное исследование удаленного тимуса с помощью современных методов сканирующей электронной микроскопии. Цель исследования — изучить возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах для морфологической и функциональной оценки тимуса, вынужденно удаленного у детей первых недель жизни с врожденными пороками сердца.

Было проведено исследование тимуса новорожденного ребенка (27-й день постнатальной жизни) с врожденным пороком сердца: дефект межжелудочковой перегородки при помощи визуализации методом сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу. Масса тимуса составила 15,7 грамма, размеры тимуса: поперечный — 3,4 см, продольный — 4,1 см, толщина — 1,7 см; объем — 12,4 см³.

Адрес для переписки:

Ведерникова Алена Владимировна
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
медицинский университет»
650000, Россия, Кемеровская область — Кузбасс,
ул. Орджоникидзе, 5, кв. 45.
Тел.: 8 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Address for correspondence:

Alena V. Vedernikova
Kemerovo State Medical University
5 Ordjonikidze St, Apt 45
Kemerovo
650000 Russian Federation
Phone: +7 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, Р.А. Мухамадияров, В.А. Кошелев,
А.В. Ведерникова, Ю.И. Ровда, Е.О. Гришачева,
И.К. Халивопуло, Н.Н. Миняйлова, А.А. Ляпин
«Возможности сканирующей электронной
микроскопии в обратно-рассеянных электронах для
морфологической и функциональной оценки тимуса,
вынужденно удаленного у детей первых недель жизни
с врожденными пороками сердца» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 625-636.
doi: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

© Шабалдин А.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Shabaldin, R.A. Mukhamadiyarov, V.A. Koshelev,
A.V. Vedernikova, Yu.I. Rovda, E.O. Grishacheva,
I.K. Khalivopulo, N.N. Minyailova, A.A. Lyapin "Applications
of EMBEDDING and backscattered scanning electron
microscopy for morphological and functional assessment of
the thymus forcibly removed in children with congenital heart
defects during the first weeks of life", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3,
pp. 625-636. doi: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

© Shabaldin A.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

Проведенное исследование показало возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах в морфологической и в функциональной оценке тимуса как центрального органа иммунной системы. Поэтапная визуализация от малых к большим увеличениям, от тканей к клеткам и внутриклеточным структурам, а также послойное исследование коркового, мозгового вещества, междольковых перегородок и сосудов, позволяет эффективно оценить функциональность тимуса. Данный метод исследования является достаточным для научных исследований вынужденно удаленного тимуса, так как дает возможность для визуализации его микроанатомии. Позволяет проводить фенотипирование клеток различных слоев тимуса, изучать межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикуло-эпителиальными клетками, тонкие особенности телец Гассалья и, наконец, процесс покидания тимуса Т-лимфоцитами.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах, тимус, тимэктомия, врожденные пороки сердца

APPLICATIONS OF EMBEDDING AND BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE THYMUS FORCEDLY REMOVED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS DURING THE FIRST WEEKS OF LIFE

Shabaldin A.V.^a, Mukhamadiyarov R.A.^a, Koshelev V.A.^a,
Vedernikova A.V.^b, Rovda Yu.I.^b, Grishacheva E.O.^a, Khalivopulo I.K.^a,
Minyailova N.N.^b, Lyapin A.A.^a

^a Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^b Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Thymectomy in a number of clinical situations is an unavoidable step of cardiac surgical treatment of congenital heart defects, but the issue of its effects on development of immunity in early ontogenesis remains open. There is still debates among scientists about the risk of immune deficiency states in children who underwent thymectomy at an early age. One may see completely different opinions, both in domestic and foreign publications. A tool for resolving this issue may be provided by morpho-functional studies of the removed thymic tissue by means of modern scanning electron microscopy techniques. The objective of our study was to assess the possibilities of EMbedding and backscattered scanning electron microscopy for morphological and functional evaluation of the thymus, which was forcedly removed in the infant patients with congenital heart defects over the first weeks of life.

The thymus of a newborn infant (postnatal day 27) with congenital heart disease: ventricular septal defect was examined using EMbedding and backscattered scanning electron microscopy imaging after embedding in epoxy resin. The mass of thymus gland was 15.7 g, the dimensions of thymus were: transverse, 3.4 cm; longitudinal, 4.1 cm; thickness, 1.7 cm; volume, 12.4 cm³.

The study showed ability of EMbedding and backscattered scanning electron microscopy in morphological and functional assessment of thymus gland considered the central organ of the immune system. Step-by-step visualization from low to high magnifications, from tissues to cells and intracellular structures, as well as layer-by-layer examination of thymic cortex, medulla, interlobular septa and vessels, allows you to effectively assess the functionality of the thymus. This research method is sufficient for scientific research of the forcedly removed thymus since it enables us to visualize its microanatomy, allowing cell phenotyping at different layers of the thymus, studying intercellular interactions of thymocytes with reticulo-epithelial cells, subtle features of Hassall's bodies and, finally, the process of T lymphocytes' release from thymus gland.

Keywords: Embedding technique, scanning electron microscopy, thymus, thymectomy, congenital heart defects

Введение

Тимэктомия в ряде клинических ситуаций является вынужденным этапом кардиохирургического лечения врожденных пороков сердца, поскольку она осуществляется только с целью обеспечения наилучшего оперативного доступа к аномально сформированному сердцу. Большинство операций проводится с искусственным кровообращением через срединную стернотомию. У части пациентов оперативное вмешательство проводится через боковой доступ (открытый артериальный проток, коарктация аорты, двойное отхождение сосудов от желудочков сердца). Удаление тимуса происходит через срединный доступ [7]. Полное удаление тимуса у детей неонатального и грудничкового периодов, так как у этих детей тимус практически прикрывает всю площадь сердца. Развитие современных технологий, проведение оперативного вмешательства во все более раннем возрасте и сразу после рождения, высокая хирургическая активность приводят к увеличению количества детей, у которых проведена частичная или тотальная тимэктомия [7]. Общеизвестно, что современная практика хирургического лечения пороков сердца позволяет оперировать детей даже в этих периодах детства, т. е. тогда, когда еще не произошло необратимого ремоделирования сосудистого ложа вследствие аномальной гемодинамики и необратимых дистрофических изменений в органах. По определению удаление тимуса (или его части) в этот период должно в той или иной степени негативно влиять на формирование иммунной системы в целом. Так, известно, что формирование центральной толерантности, как основной функции тимуса, продолжается после рождения ребенка, примерно до 28-го дня постнатальной жизни. В этот период происходит ограничение иммунных ответов на микроокружение новорожденного ребенка, в том числе на симбионтную микрофлору матери и ближнего окружения. С этих позиций, способ вынужденного «отключения» органа от процесса «иммунного обеспечения» организма (особенно в раннем возрасте) не мог оставаться без внимания научного медицинского сообщества, где дискуссии по этому вопросу продолжаются.

В то же время удаленный тимус детей неонатального периода почти не исследовался современными методами сканирующей электронной микроскопией, позволяющей детально изучить тонкую структуру тканей и клеток тимуса [3, 12]. В рамках общей концепции тимуса как единственного центрального органа иммунной системы у человека, эти исследования могут дать дополнительную научную информацию о его функционировании в неонатальном периоде, а с одновременным использованием иммунологиче-

ских методов — получить новые знания о формировании иммунопатологии у тимэктомированных детей в последующем онтогенезе.

Сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах (СЭМ ОРЭ) является современным методом морфологической оценки тканей, при помощи которого возможно визуализировать макро и микроанатомии тимуса, изучить межклеточные взаимодействия, а также ультраструктурные особенности субклеточных органелл. Данный метод апробирован в ряде кардиологических исследованиях, которые опубликованы в отечественной и зарубежной печати [4, 20, 21]. В то же время исследований тимуса детей с помощью СЭМ ОРЭ не так много и, особенно, у детей первых недель жизни.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** — изучить возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах для морфологической и функциональной оценки тимуса, вынужденно удаленного у детей первых недель жизни с врожденными пороками сердца.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной задачи было проведено исследования тимуса новорожденного ребенка (27-й день постнатальной жизни) с врожденным пороком сердца (дефект аортолегочной перегородки, дефект межпредсердной перегородки вторичного типа, дефект межжелудочковой перегородки) с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. Выполнено полное удаление тимуса через срединный доступ (срединная стернотомия) при кардиохирургической операции по закрытию септальных дефектов.

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». До включения в работу от матери ребенка было получено письменное информированное согласие.

Были измерены масса и размеры тимуса. Масса тимуса составила 15,7 грамма, размеры тимуса: поперечный — 3,4 см, продольный — 4,1 см, толщина — 1,7 см; объем — 12,4 см³. Это соответствует макроскопической категории мезотимуса.

Извлеченный тимус быстро промывали в охлажденном физиологическом растворе и помещали в забуференный (pH 7,4) 10%-ный водный раствор формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 часов каждая) биоматериал постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в

0,1 М фосфатном буфере в течение 12 часов, затем окрашивали 2%-ным тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50%-ный, 60%-ный, 70%-ный, 80%-ный и 95%-ный этанол, все по две смены, каждая смена по 15 минут), окрашивали 2%-ным уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-ном этаноле (5 часов), обезвоживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном («Реахим», Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Araldit 502 (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию заливочной смеси эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в свежей порции смолы в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60 °С. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (ЕМ ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов проводили при помощи оригинального метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу на сканирующем электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 или 15 кВ [4].

Визуализацию структур тимуса проводили по следующей схеме. Для оценки тканей тимуса: долячатость его структуры, соотношение коркового и мозгового слоя, характеристика соединительнотканых перегородок, разделяющих долики и сосуды в них — проводилась визуализация с увеличением 50 и 250. Исследования клеток и межклеточных взаимодействий в корковом и мозговом слоях тимуса проводили при увеличении от 1,00 к до 7,50 к. Тельца Гассалья и выход Т-лимфоцитов в капилляры изучались на увеличениях от 5,00 к до 7,50 к.

Результаты

Гистологические исследования удаленного тимуса проводятся в обязательном порядке в патолого-анатомическом бюро. Как правило, при окрашивании (гематоксилин-эозин) гистологических срезов тимуса анализируется долячатость его строения, соотношения коркового и мозгово-

го вещества в долях, выраженность жировой и соединительно-тканой инволюции. В то же время качественно оценить межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикулоэпителиальными клетками при этой визуализации не удается.

В представленном примере можно видеть полностью сохранившийся тимус (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки) с нормальной массой и размерами для четырехнедельного ребенка.

Микроскопическое исследование при увеличении 50 (рис. 2) позволяет оценить долячатость строения тимуса и вычислить соотношение коркового (А) и мозгового (В) вещества (слоев) в доле. Как видно из рисунка 2, в исследуемом тимусе сохранено нормальное соотношение (2/1) коркового и мозгового слоев во всех долях [3], долики разделены соединительноткаными тяжами, в которых визуализируются кровеносные сосуды разных диаметров. Жировая ткань отсутствует. Это указывает на физиологическое функционирование тимуса в этот возрастной период, а его удаление является рисковым фактором для формирования иммунопатологических состояний в последующем онтогенезе.

Визуализации микроскопического строения тимуса на средних увеличениях, фокусируясь на междолевой соединительнотканной перегородке, позволяет оценить стенки кровеносных сосудов (рис. 3). Как видно из рисунка 3, сосудистые стенки артериолы и вены сформированы тремя слоями (соединительнотканый, мышечный и эндотелиальный) и не имеют патологических включений.

Далее проведен анализ клеточного состава коркового вещества тимической долики (рис. 4). Наибольший интерес представляют межклеточные взаимодействия ретикулоэпителиальных клеток коркового слоя (эпителиоцитов) и лимфоцитов тимуса (timoцитов) различной степени дифференцировки с преобладанием гетеро- или эухроматина различной конденсации и маргинации. Эта микроскопическая картина показывает, что в тимусе (в его корковом слое) идут процессы, специфичные только для него, это созревание и отбор (положительная и отрицательная селекции) Т-клеточного рецептора на тимоцитах через их контакты с эпителиоцитами. На рисунке 5 при визуализации на больших увеличениях (до 7,50 к) отлично видны отростки эпителиоцита, его межклеточные контакты с тимоцитами, а также электронно-плотные гранулы внутри самой эпителиальной клетки коркового слоя. Внутриклеточное строение эпителиоцита представлено электронно-плотными гранулами, в цитоплазме также визуализируются митохондрии и мембраны эндоплазматической сети. Морфологическое строение ядра представлено его округлой

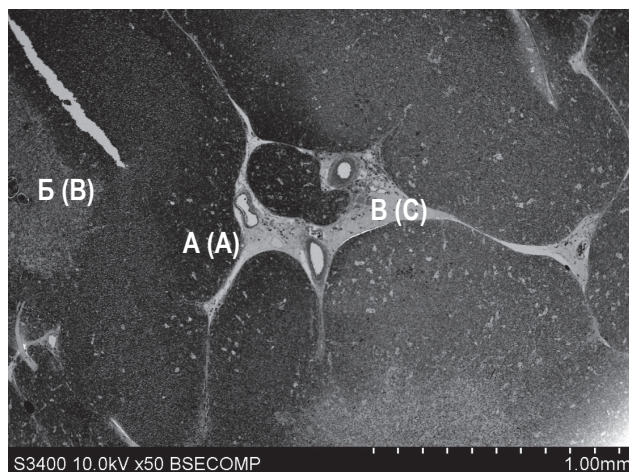


Рисунок 2. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 50×. Визуализируются дольки тимуса: А – корковое вещество; Б – мозговое вещество; В – междольковые перегородки.

Figure 2. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 50×. The thymus lobules are visualized: A, cortical substance; B, medulla; C, interlobular septa.

формой с умеренной конденсацией хроматина и маленьким темным ядрышком в его центре. В ядре эпителиоцита хорошо детектируется ядерная мембрана. Полученные микроскопические характеристики коркового вещества тимуса дополнительно указывают на эффективное функционирование эпителиоцитов, образующих широкопетлистую сеть за счет своих отростков. На рисунке 4 видны и макрофагальные клетки, участвующие с позитивной и негативной селекцией Т-клеточных рецепторов, экспрессируемых на тимоцитах. В целом эта морфологическая картина коркового слоя тимуса указывает на функциональную состоятельность органа, в котором продолжается иммуногенез, так необходимый для последующего развития ребенка.

На рисунке 6 показано микроскопическое строение коркового слоя тимуса, где в дифференцировке тимоцитов участвуют и другие клетки тимуса (макрофаги (А), клетки-няньки (ретiculoэпителиоциты с инвагинированными тимоцитами, Б), эпителиоциты (В)). Эти активные межклеточные взаимодействия в сети ретикулоэпителиальных клеток хорошо визуализируются при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ и могут быть главными критериями функциональности тимуса, вынужденно удаленного у детей неонатального периода. Одним из важных морфологических критериев клеточных взаимодействий, относящихся к ретикулоэпителиальным клеткам второго типа, является инвагинация в них тимоцитов, что наглядно видно на рисунке 6.

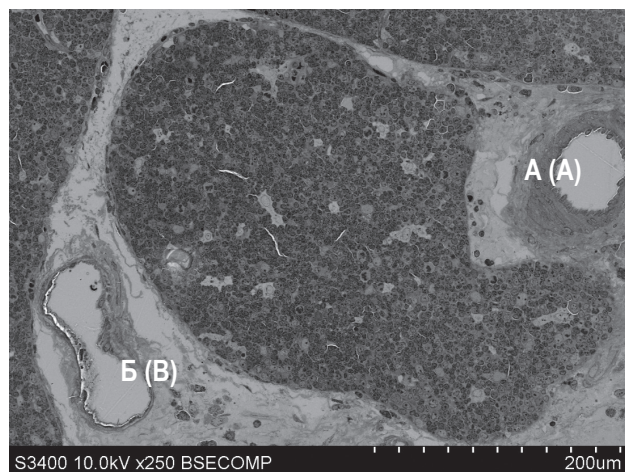


Рисунок 3. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 250×. Визуализация стенок сосудов. А – артериола; Б – венола.

Figure 3. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 250×. Visualization of vessel walls. A, arteriole; B, venule.

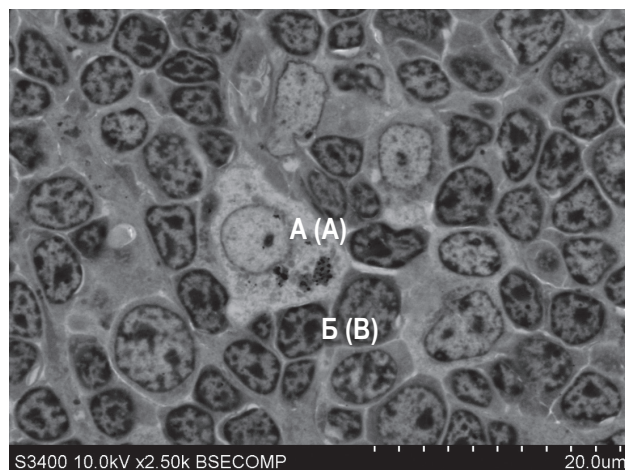


Рисунок 4. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 2,50 к. Корковый слой тимической дольки. Взаимодействие эпителиоцитов (А) с тимоцитами (Б)

Figure 4. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 2.50 k. Cortical layer of the thymic lobule. Interaction of epithelial cells (A) with thymocytes (B)

В целом эпителиальные клетки (ретiculoэпителиальные клетки) коркового слоя тимуса создают ретикулярную сеть коркового слоя, что видно на рисунках 4 и 6.

Далее морфологическому анализу с помощью оригинального метода СЭМ ОРЭ подверглось мозговое вещество тимуса с его главными мор-

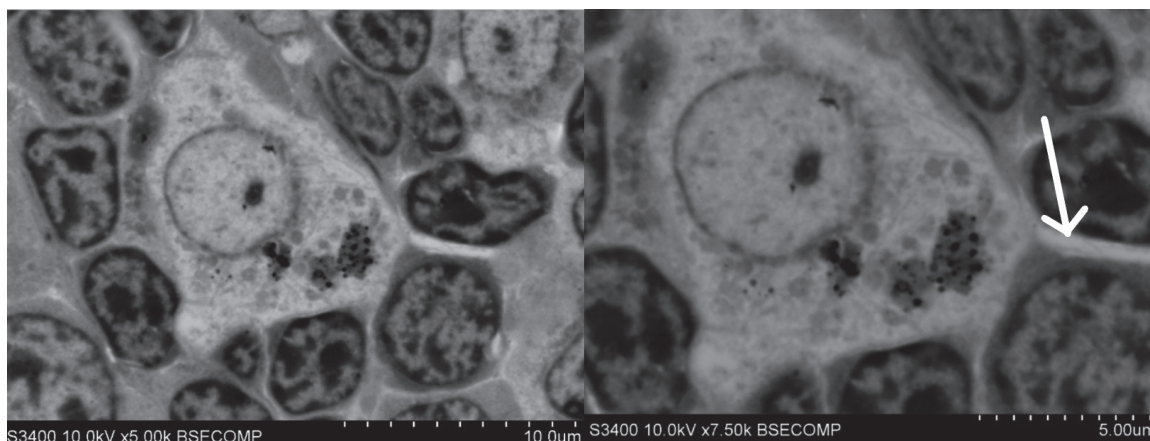


Рисунок 5. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Увеличение эпителиоцита и контактирующих с ним тимоцитов от 5,00 к до 7,50 к. Стрелками указаны отростки эпителиоцита.

Figure 5. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Enlargement of the epithelial cell and thymocytes in contact with it from 5.00 k to 7.50 k. The arrows indicate the processes of the epithelial cell.

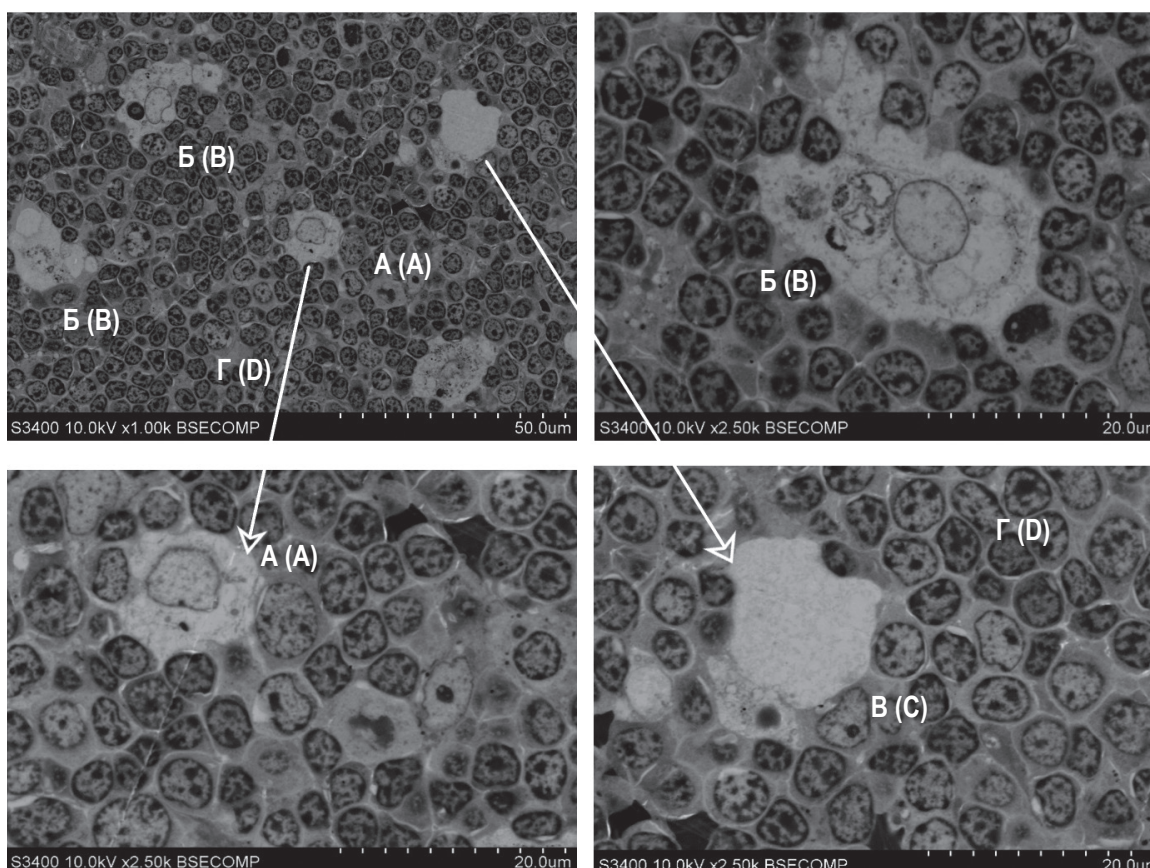


Рисунок 6. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Кортикное вещество тимуса. Увеличение от 1,00 к до 2,50 к. Стрелками указаны увеличенные клетки. Макрофаги (А), клетки-няньки (Б), эпителиоциты (В), тимоциты (Г).

Figure 6. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Thymic cortex. Increase from 1.00 k to 2.50 k. Arrows indicate enlarged cells. Macrophages (A), nurse cells (B), epithelial cells (C), thymocytes (D).

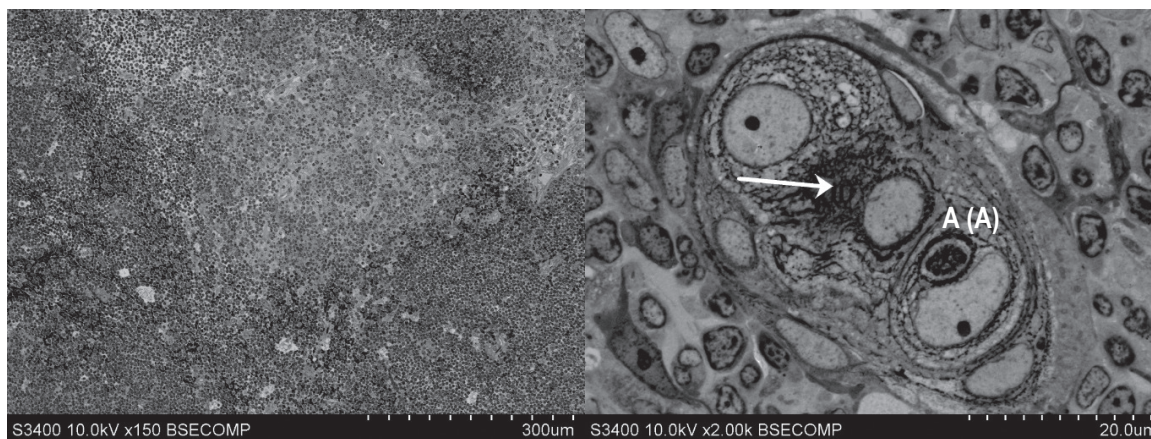


Рисунок 7. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, его мозгового слоя с увеличением 150 к (слева) и 2,00 к (справа, тельце Гассалья), объект фагоцитоза (А). Эндоплазматическая сеть показана стрелкой.

Figure 7. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, its medulla with a magnification of 150 k (left) and 2.00 k (right, Hassall's body), an object of phagocytosis (A). The endoplasmic reticulum is shown by an arrow.

фологическими элементами — тельцами Гассалья (рис. 7).

Как видно из рисунка 7, мозговое вещество дольки тимуса имеет электронно-светлую плотность с равномерно распределенными по всему веществу клетками. Тельце Гассалья представлено слившимися ретикулоэпителиальными клетками мозгового слоя с другими сильно уплощенными клетками и с объектом фагоцитоза внутри них. В одной из клеток просматривается электронно-плотная эндоплазматическая сеть, похожая на эндоплазматический ретикулум. Эти два выявленных морфологических объекта показывают на основные функции телец Гассалья: фагоцитоз клеток, вступивших в апоптоз, и активный синтез протеинов, в том числе тимических гормонов и цитокинов (интерлейкина-7).

Визуализация мозгового слоя долек тимуса на больших увеличениях показала гетерогенность его клеточного состава (рис. 8).

Как видно из рисунка 8, в мозговом слое дольки тимуса отсутствуют межклеточные взаимодействия тимоцитов с эпителиоцитами мозгового слоя, макрофагами и дендритными клетками, а также нет так называемой ретикулярной сети. Тимоциты представлены клетками разных размеров с преимущественным конденсированным гетерохроматином внутри их ядер. Гетерогенность всех мононуклеаров преимущественно связана с их размером. Большие мононуклеары с округлым ядром могут быть ранними формами лимфоцитарного ряда (лимфобластами). Вполне допустимо, что это тимические прогениторные клетки, которые поддерживают иммуногенез в постнатальном периоде, когда перестает работать

транспорт предшественников Т-лимфоцитов из красного костного мозга.

На рисунке 9 представлена микрофотография возможного выхода дифференцированного тимоцита/Т-лимфоцита из тимического вещества в просвет сосуда для дальнейшего его транспорта в периферические органы иммунной системы.

Тем самым этим микроснимком можно документировать один из важных функциональных компонентов тимуса — его покидание зрелыми тимоцитами, а в дальнейшем — так называемыми

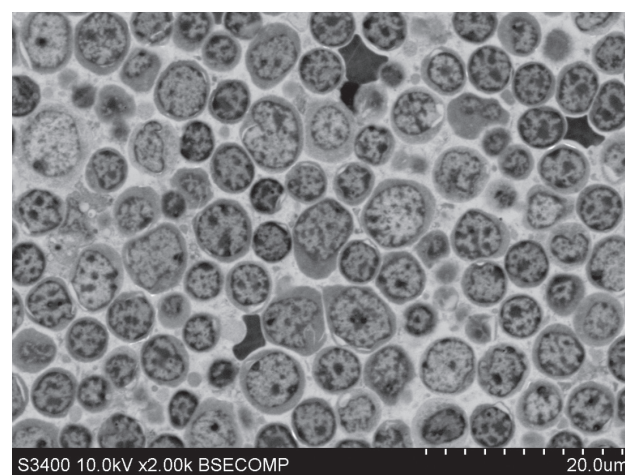


Рисунок 8. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Клеточный состав мозгового слоя дольки тимуса. Увеличение 2,00 к.

Figure 8. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Cellular composition of the medulla of the thymus lobule. Magnification 2.00 k.

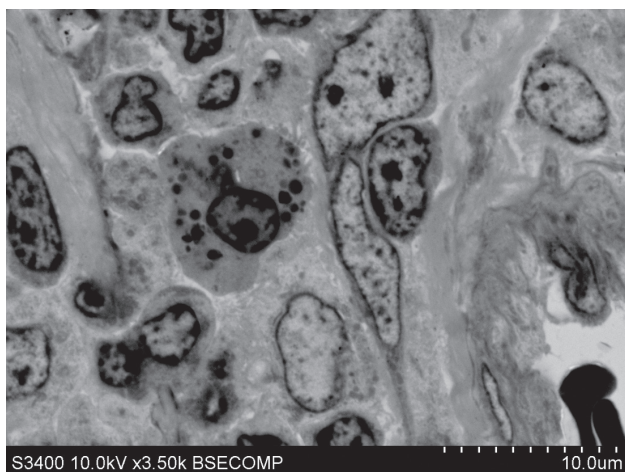


Рисунок 9. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Диapedез тимоцита в просвете капилляра для дальнейшего транспорта в периферические органы иммунной системы. Увеличение 3,50 к.

Figure 9. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Diapedesis of the thymocyte into the lumen of the capillary for further transport to the peripheral organs of the immune system. Magnification 3.50 k.

ми недавними мигрантами из тимуса (RTE — $CD45^+CD31^+$), которые после встречи с антигеном становятся зрелыми Т-лимфоцитами.

Таким образом, проводя анализ тимуса при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ и используя вариативность увеличительной способности микроскопа, возможно визуализировать макро- и микроанатомию тимуса, а также ультраструктурные особенности клеток и субклеточных органелл. Такие морфологические параметры дают возможность получить исчерпывающую характеристику о функционировании вынужденно удаленного тимуса и предположить возможные последствия для иммунной системы ребенка в дальнейшем. В то же время дискуссионные вопросы о наличии иммунных нарушений у кардиохирургических пациентов с вынужденной тимэктомией в анамнезе представлены в обсуждении.

Обсуждение

С позиции современных знаний тимус является единственным центральным органом иммунной системы человека [2, 8]. Основной его функцией является антиген-независимая дифференцировка Т-лимфоцитов от стадии double negative до стадии single positive, которая проходит преимущественно в корковом слое тимуса, в так называемой сети эпителиальных кортикальных клеток (ретикулоэпителиальных клеток). Эта сеть

образована отростками этих клеток. Большим количеством исследований, при совмещении электронной микроскопии и иммуногистохимии на экспериментальных животных, была доказана основная гипотеза о позитивной и негативной селекции в тимусе, лежащей в основе центральной толерантности к аутоантигенам [14, 17, 22]. Принимая во внимание этот огромный пласт исследований, можно считать доказанными основные положения этой теории, в которой большое значение отводится межклеточным контактам. Прежде всего это контакты кортикальных ретикулоэпителиальных клеток и тимоцитов. Именно этот тимический этап отлично визуализируется при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ. Другие этапы создания центральной толерантности, такие как апоптоз и фагоцитоз тимоцитов, непрошедших этапы позитивной и негативной селекции, также хорошо визуализируются при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ. И наконец этап покидания тимуса в мозговом слое single positive Т-лимфоцитом также можно обнаружить с помощью данного оригинального метода. Соответственно, не прибегая к дополнительным гистохимическим исследованиям, но с учетом доказанных положений внутритимической дифференцировки тимоцитов, можно использовать оригинальный метод СЭМ-ОРЭ для дальнейших научных исследований вынужденно удаленного тимуса у детей неонатального периода с врожденным пороком сердца с целью оценки его функциональности. Кроме того, с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу есть возможность проводить дифференцировку типов ретикулоэпителиальных клеток, а по их представительству в корковом и мозговом слоях тимуса выделять различные отклонения в функционировании тимуса у детей неонатального периода [3]. Также электронная микроскопия тимуса позволяет оценить так называемые эпителиально-мезенхимальные переходы в тимусе. Оценка этого процесса очень важна для удаленных тимусов как объектов получения стромальных прогениторных клеток, способных создать новое тимическое микроокружение в лабораторных условиях для последующей трансплантации [12].

В то же время остановимся на противоречивых аспектах последствий ранней тимэктомии.

Так, клинический аспект последствий тимэктомии не отличается однородностью. В одних случаях результаты демонстрировали достаточно позитивную картину, как, например, в исследовании, проведенном Wells W.J. и соавт. (1998), где в процессе катамнестического наблюдения в течение первого года жизни (после тимэктомии) ни один из исследуемых пациентов не нуждался в

госпитализации из-за инфекции. Было обычное и ожидаемое количество легких инфекционных заболеваний, включая случаи конъюнктивита, синусита, отита и бронхита, большинство из которых, лечили антибиотиками амбулаторно. Среднее количество инфекционных заболеваний на одного пациента составило 3 в течение года (95% ДИ 1,4). Не было отмечено увеличения заболеваемости кандидозом, который обычно считается клиническим критерием Т-клеточного иммунодефицита [26]. Не показало увеличение частоты инфекций (после тимэктомии у новорожденных) исследование Afifi A и соавт. (2010), причем даже при наличии изменений в популяции Т-клеток [9]. В нижеперечисленных источниках также не наблюдалось ни клинически значимого иммунодефицита, ни повышенной частоты аутоиммунных заболеваний по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста [13, 19, 24].

В других случаях выявлялось статистически значимое превышение вирусно-бактериальной инфекции, проявляющейся многократными отитами, ОРВИ, пневмонией; госпитализаций по случаю тяжело протекающей инфекции. Кроме того, частота госпитализаций, связанных с инфекционными заболеваниями, больше увеличилась у пациентов с полной, а не частичной тимэктомией. Послеоперационный катамнез у этой группы детей составлял в среднем 18 лет [15, 18]. В ретроспективном шведском популяционном когортном исследовании авторы изучали частоту аутоиммунных, инфекционных и atopических заболеваний, а также злокачественных новообразований в связи с ранней тимэктомией у больных с ВПС в возрасте до 5 лет. Пациенты, перенесшие тимэктомию, имели повышенный риск аутоиммунных заболеваний, гипотиреоза, глютеновой болезни, а также возникновения инфекций по сравнению с контрольной группой, перенесшей раннюю операцию на сердце без тимэктомии. По сравнению с общей популяцией того же пола и возраста у пациентов после тимэктомии чаще развивались рак, аутоиммунные заболевания и atopические заболевания, а также был значительно более высокий риск соответствующих бактериальных и вирусных инфекций (63,1% против 23,1%) [16].

Wienecke L.M. и соавт. (2022) высказывают предположение о вероятной связи хронического воспаления и иммунного старения у взрослых, прооперированных в детстве по поводу ВПС с сочетанной тимэктомией. Эти пациенты могут составлять группу риска при заболевании, например COVID-19, и они по-прежнему страдают от заметно более высокой и преждевременной заболеваемости и смертности. Ведущими причинами смерти у взрослых с ВПС (и тимэктомирован-

ных) являются сердечная недостаточность (43%), такие инфекции, как пневмония и эндокардит (12%), а также внезапная сердечная смерть [27].

Собственные исследования клеточного состава периферической крови у детей с вынужденной тимэктомией показали развитие абсолютной или относительной нейтропении и лимфоцитопении; последней — за счет лимфоцитов различных фенотипов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD45RA^+$, $CD31$) — в разных вариациях [5, 6]. Снижение уровня Т-лимфоцитов $CD4$ было больше, чем Т-лимфоцитов $CD8$, главным образом за счет $CD45RA^+$ субпопуляции [25]. Prelog M. и соавт. (2008) свидетельствовали о том, что тимэктомия в раннем детстве у исследуемых приводила к значительным изменениям периферической субпопуляции $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$ — наивных Т-клеток, которые напоминают признаки старения иммунной системы у пожилых людей после инволюции тимуса [23]. В частности, отмечалось увеличение Т-клеток памяти и связанное с этим нарастание титров аутоантител (ANA, ANCA) [11].

Некоторые авторы связывали с тимэктомией с ухудшением параметров гуморального иммунитета и системы фагоцитирующих мононуклеаров [10].

Учитывая столь противоречивые результаты последствий тимэктомии, возникает вопрос о первопричине такого исхода. По определению, благоприятный прогноз может быть связан с более зрелым возрастом ребенка, подвергшегося тимэктомии (например старше 1,5-2 лет), когда тимопоэтическая функция вилочковой железы наиболее активная и имеет место более активная миграция из тимуса так называемых недавних эмигрантов из тимуса (RTE , $CD45^+CD31^+$) на периферию (в ткани) с трансформацией в полноценные эффекторные Т-лимфоциты. Такой же результат можно ожидать у тимэктомированных детей более раннего возраста, когда изначально нормально сформированный тимус имеет генетически детерминированную большую функциональную потенцию в сравнении с детьми популяции аналогичного возраста. Негативные последствия тимэктомии могут быть связаны с относительно более ранним оперативным вмешательством (ранее 1,5-2 лет) или морфологически и функционально незрелой вилочковой железой к моменту этого радикального вмешательства. В этом случае передача RTE на периферию относительно более низкая и более низкое формирование зрелых Т-лимфоцитов. Представленный оригинальный метод сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах тимуса в этом случае поможет определиться со степенью его зрелости к моменту операции и тем самым поможет внести определенный вклад в аналитику прогноза.

На основании большого количества исследований многие авторы считают, что нужно поставить под сомнение все еще практикуемое хирургическое удаление ткани вилочковой железы при операции на сердце у детей в условиях искусственного кровообращения и начать дальнейшие долгосрочные исследования последствий тимэктомии и развития системного воспалительного ответа [1, 6, 27]. В этом отношении морфофункциональные исследования тимуса до удаления с помощью ультразвуковых методов исследования и удаленного тимуса с помощью самодостаточного метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах, с параллельным исследованием иммунных показателей периферической крови, в том числе уровней TREC и KREC, позволят получить новые знания о механизмах развития иммунных нарушений в последующем онтогенезе.

Заключение

Полученные данные показали возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах в морфологической и в функциональной оценке тимуса, как центрального органа иммунной системы, вынуждено удаленного у детей первых недель жизни

с врожденными пороками сердца. Поэтапная визуализация от малых к большим увеличениям, от тканей к клеткам и внутриклеточным структурам, а также послойное исследование коркового, мозгового вещества, междольковых перегородок и сосудов позволят эффективно оценить функциональность тимуса.

Данный метод исследования является достаточно точным для научных исследований вынужденно удаленного тимуса, так как дает возможность показывать клеточный состав различных слоев тимуса, межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикулоэпителиальными клетками коркового и мозгового слоев тимуса, тонкие особенности телец Гассалья и, наконец, процесс покидания тимуса Т-лимфоцитами.

Дальнейшие исследования тимуса с помощью оригинального метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах позволят определить цифровые значения для каждого из вышеописанных процессов, а проводя дальнейшее наблюдение за этими детьми (с тимэктомией) с учетом их инфекционной, аллергической и другой иммунопатологии, можно будет выделить внутритимические микроанатомические маркеры различных первичных функциональных состояний тимуса (реактивно избыточное, депрессивное, эйтоничное).

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Modern methods of limiting the systemic inflammatory response in the correction of congenital heart defects in children under cardiopulmonary bypass. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* = *Complex Problems of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58. [Kozlov V.A. Determining role of thymus in immune pathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-57-62.
3. Кулида Л.В., Перетятко Л.П., Назаров С.Б. Варианты патоморфологических изменений тимуса у внутриутробно инфицированных новорожденных с экстремально низкой массой тела // Архив патологии, 2014. Т. 76, № 3. С. 1319. [Kulida L.V., Peretiatko L.P., Nazarov S.B. Variants of pathomorphological changes in the thymus of in utero infected extremely low birth weight neonatal infants. *Arkhiv patologii* = *Pathology Archive*, 2014, Vol. 76, no. 3, pp. 13-19. (In Russ.)]
4. Мухамадияров Р.А., Кошелев В.А., Фролов А.В., Миронов А.В., Шабает А.Р., Евтушенко А.В., Ляпин А.А., Кутихин А.Г. Ультраструктура неоинтими нативных и искусственных элементов системы кровообращения // Архив патологии, 2022. Т. 84, № 3. С. 14-23. [Mukhamadiyarov R.A., Koshelev V.A., Frolov A.V., Mironov A.V., Shabaev A.R., Evtushenko A.V., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. Ultrastructure of neointima of native and artificial elements of the blood circulatory system. *Arkhiv patologii* = *Pathology Archive*, 2022, Vol. 84, no. 3, pp. 1423. (In Russ.)]
5. Ровда Ю.И., Шмелевич С.А., Шабалдин А.В., Лукоянычева Е.Б. Особенности субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих CD45RA- и CD31-маркеры, у детей после тимэктомии, выполненной при хирургическом лечении врожденного порока сердца // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 119-128. [Rovda Yu.I., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V., Lukoyanycheva E.B. Subpopulation profiles of t helper cells expressing CD45RA and CD31 markers in children after thymectomy performed upon surgical

treatment of congenital heart disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 119-128. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128.

6. Ровда Ю.И., Шмелевич С.А., Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Миняйлова Н.Н., Сизова И.Н., Лукоянычева Е.Б. Клинико-иммунологические характеристики детей в катамнезе, после операции по поводу врожденного порока сердца, сочетанной с вынужденной тимэктомией // Педиатрия, 2018. Т. 97, № 4. С. 50-58, [Rovda Y.I., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V., Shabaldina E.V., Minyaylova N.N., Sizova I.N., Lukoyanycheva E.B. Clinical and immunological characteristics of children in a catamnesis after surgery for congenital heart diseases, combined with induced thymectomy. *Pediatrics = Russian Pediatrics*, 2018, Vol. 97, no. 4, pp. 50-58. (In Russ.)]

7. Смолягин А.И., Фроленко А.Л., Продеус А.П., Ярилин А.А. Иммунный статус детей после оперативного лечения по поводу врожденных пороков сердца // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. № 2-1 (35). С. 200-201. [Smolyagin A.I., Frolenko A.L., Prodeus A.P., Yarilin A.A. Immune status of children after surgical treatment for congenital heart defects. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2011, no. 2-1 (35), pp. 200-201. (In Russ.)]

8. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Т-клетки – недавние эмигранты из тимуса // Иммунология, 2012. Т. 33, № 6. С. 326-334. [Yarilin A.A., Donetskova A.D. T cells are recent emigrants from the thymus. *Immunologiya = Immunology*, 2012, Vol. 33, no. 6, pp. 326-334. (In Russ.)]

9. Afifi A., Raja S.G., Pennington D.J., Tsang V.T. For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 287-291.

10. Brearley S., Gentle T.A., Roberts K.D., Abra L.D., Thompson R.A. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin. Exp. Immunol.*, 1987, Vol. 70, pp. 322-327.

11. Broek T., Madi A., Delemarre E.M., Schadenberg A.W.L., Tesselaar K., Borghans J.A.M., Nierkens S., Redegeld F.A., Otten H.G., Rossetti M., Albani S., Sorek R., Cohen I.R., Jansen N.J.G., van Wijk F. Human neonatal thymectomy induces altered B-cell responses and autoreactivity. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 11, pp. 1970-1981.

12. Campinoti S., Gjinovci A., Ragazzini R., Zanieri L., Ariza-McNaughton L., Catucci M., Boeing S., Park J.-E., Hutchinson J.C., Muñoz-Ruiz M., Manti P.G., Vozza G., Villa C.E., Phylactopoulos D.-E., Maurer C., Testa G., Stauss H.J., Teichmann S.A., Sebire N.J., Hayday A.C., Bonnet D., Bonfanti P. Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 6372. doi: 10.1038/s41467-020-20082-7.

13. Eysteinsdottir J.H., Freysdottir J., Haraldsson A., Stefansdottir J., Skaftadottir I., Helgason H., Ogmundsdottir H.M. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 136, no. 2, pp. 349-355.

14. Gunther-Cummins L., Lagou M., Guzik H., DesMarais S., Karagiannis G., DesMarais V., Macaluso F.P. Method development: characterization of the structure of the thymic epithelial cell network utilizing fluorescent whole slide scanning and 3D SEM array tomography. *Microsc. Microanal.*, 2023, Vol. 29, Iss. 29 Suppl. 1, pp. 1217-1218.

15. Gudmundsdottir J., Óskarsdóttir S., Skogberg G., Lindgren S., Lundberg V., Berglund M., Lundell A.C., Berggren H., Fasth A., Telemo E., Ekwall O. Early thymectomy leads to premature immunologic ageing: An 18-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 5, pp. 1439-1443.e10.

16. Gudmundsdottir J., Söderling J., Berggren H., Óskarsdóttir S., Neovius M., Stephansson O., Ekwall O. Long-term clinical effects of early thymectomy: Associations with autoimmune diseases, cancer, infections, and atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 6, pp. 2294-2297.e8.

17. Kisielow P. How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. *Immunogenetics*, 2019, Vol. 71, pp. 513-518.

18. Kurobe H., Tominaga T., Sugano M., Hayabuchi Y., Egawa Y., Takahama Y., Kitagawa T. Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2013, Vol. 145, no. 3, pp. 656-662, 662.e1-2; discussion 662.

19. Mancebo E., Clemente J., Sanchez J., Ruiz-Contreras J., de Pablos P., Cortezon S., Romo E., Paz-Artal E., Allende L.M. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, Vol. 154, no. 3, pp. 375-383.

20. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. EMbedding and backscattered scanning electron microscopy: a detailed protocol for the whole-specimen, high-resolution analysis of cardiovascular tissues. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 739549. doi: 10.3389/fcvm.2021.739549.

21. Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Backscattered scanning electron microscopy approach for assessment of microvessels under conditions of normal microanatomy and pathological neovascularization. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2020, Vol. 169, no. 4, pp. 525-530.

22. Ohigashi I., Frantzeskakis M., Jacques A., Fujimori S., Ushio A., Yamashita F., Ishimaru N., Yin D., Cam M., Kelly M.C., Awasthi P., Takada K., Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8⁺ T cells in the cortex independent of negative selection. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 4, e20201904. doi: 10.1084/jem.20201904.

23. Prelog M., Keller M., Geiger R., Brandstätter A., Würzner R., Schweigmann U., Zlamy M., Zimmerhackl L.B., Grubeck-Loebenstein B. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+) CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 130, no. 2, pp. 123-132.
24. Roosen J., Oosterlinck W., Meyns B. Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2015, Vol. 20, no. 1, pp. 101-106.
25. Torfadottir H., Freysdottir J., Skaftadottir I., Haraldsson A., Sigfiisson G., Ogmundsdottir H.M. Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 145, no. 3, pp. 407-412.
26. Wells W.J., Parkman R., Smogorzewska E., Barr M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, Vol. 115, no. 5, pp. 1041-1046.
27. Wienecke L.M., Cohen S., Bauersachs J., Mebazaa A., Chousterman B.G. Immunity and inflammation: the neglected key players in congenital heart disease? *Heart Fail. Rev.*, 2022, Vol. 27, pp. 1957-1971.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Мухамадияров Р.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Кошелев В.А. — лаборант-исследователь, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Ведерникова А.В. — ассистент кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Ровда Ю.И. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Гришачева Е.О. — детский кардиолог отделения кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Халивопуло И.К. — кардиохирург, заведующий отделением кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Миняйлова Н.Н. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Ляпин А.А. — сердечно-сосудистый хирург отделения кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Mukhamadiyarov R.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Koshelev V.A., Laboratory Assistant, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Vedernikova A.V., Assistant Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Rovda Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Grishacheva E.O., Pediatric Cardiologist, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khalivopulo I.K., Chief Regional Specialist for Cardiovascular Surgery, Head, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Minyailova N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Lyapin A.A., Cardiovascular Surgeon, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 31.10.2023

Отправлена на доработку 13.11.2023

Принята к печати 14.11.2023

Received 31.10.2023

Revision received 13.11.2023

Accepted 14.11.2023